

农杆菌介导抗储粮害虫转基因小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的获得及分析 Transgenic Wheat (*Triticum aestivum* L.) with Increased Resistance to the Storage Pest Obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

毕瑞明^{1,2}, 贾海燕¹, 封德顺¹, 王洪刚^{1*}

BI Rui-Ming^{1,2}, JIA Hai-Yan¹, FENG De-Shun¹ and WANG Hong-Gang^{1*}

1 国家小麦改良中心泰安分中心, 山东省作物生物学重点实验室, 山东农业大学农学院, 泰安 271018

2 菏泽学院生命科学系, 菏泽 274015

1 Subcenter of National Wheat Improvement Center, The Key Laboratory of Crop Biology of Shandong. Agronomy College of Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2 Department of Life Science of Heze College, Heze 2740151, China

摘 要 以本实验室选育的小麦优良品系的胚性愈伤组织为材料, 采用农杆菌介导将抗虫基因豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *CpTI* 转入小麦培养细胞, 经筛选获得抗卡那霉素的愈伤组织并再生植株。经 PCR 和实时 PCR 检测、PCR-Southern 和 Southern blot 验证, 确定了 3 株独立再生植株为含有 *CpTI* 的转基因植株。农杆菌浓度、侵染时间及转化处理方式对小麦转化率均有明显影响。3 株转基因植株正常可育并结籽, 形成转基因株系。外源基因在转基因植株 T₁ 代中的分离呈多样性, 部分株系 (转基因株系 T-I、T-III) 表现出孟德尔遗传规律。抗虫试验表明, 3 株转基因植株 T₂ 代籽粒对储粮害虫麦蛾具有一定的抗性, 转基因株系 T-I、T-II、T-III 及非转基因植株的 T₂ 代籽粒虫蚀率分别为 19.8%、21.9%、32.9% 和 58.3%。转基因植株 T₁ 代群体农艺性状调查显示, 3 个株系具有良好的农艺性状, 为小麦的遗传改良提供了新的种质抗虫材料。

关键词 根癌农杆菌, *CpTI* 基因, 储粮害虫, 转基因小麦

中图分类号 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)03-0431-07

Abstract The transgenic wheat of improved resistance to the storage pest was production. We have introduced the cowpea trypsin inhibitor gene (*CpTI*) into cultured embryonic callus cells of immature embryos of wheat elite line by *Agrobacterium*-mediated method. Independent plantlets were obtained from the kanamycin-resistant calli after screening. PCR and real time PCR analysis, PCR-Southern and Southern blot hybridization indicated that there were 3 transgenic plants *viz.* transformed- I, II and III (T-I, T-II and T-III). The transformation frequencies were obviously affected by *Agrobacterium* concentration, the infection duration and transformation treatment. The segregations of *CpTI* in the transgenic wheat progenies were not easily to be elucidated, and some transgenic wheat lines (T-I and T-III) showed Mendelian segregations. The determinations of insect resistance to the stored grain insect of wheat *viz.* the grain moth (*Sitotroga cerealella* Olivier) indicated that the 3 transgenic wheat progeny seeds moth-resistance was improved significantly. The seed moth-eaten ratio of T-I, T-II, T-III and non-transformed control was 19.8%, 21.9%, 32.9% and 58.3% respectively. 3 transgenic wheat T₁ PCR-positive plants revealed

Received: October 31, 2005; Accepted: January 10, 2006.

This work was supported by a grant from Agriculture Structure Regulation and Importance Technology Research Program of Agriculture Department of China (No. 04-02-05B).

* Corresponding author. E-mail: hgwang@sdau.edu.cn

农业部农业结构调整重大技术研究专项资助(No. 04-02-05B)。

that the 3 transgenic lines had excellent agronomic traits. They supplied good germplasm resource of insect-resistance for wheat genetic improvement.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, cowpea trypsin inhibitor gene, storage pest, transgenic wheat

储粮害虫的危害是农业生产中的重要问题。麦蛾(*Sitotroga cerealella* Olivier)是世界性储粮害虫,在粮仓内及田间都能繁殖,发生普遍,为害严重。麦蛾幼虫蛀食麦粒、稻谷、玉米等种子,受害粮粒大部分被蛀空,重量损失可达60%~80%,是我国三大储粮害虫(玉米象、谷蠹、麦蛾)之一^[1]。目前农业生产中对储粮害虫的防治,以化学防护剂和熏蒸剂为主,长期大量使用化学试剂,会造成环境污染、资金消耗、害虫对试剂产生抗性等一系列问题。利用现代生物技术,进行小麦遗传改良,培育小麦抗虫新品种,增加小麦抗虫种质资源,是进行小麦生物防治的一个重要方面。

进行小麦遗传改良的策略很多,利用植物基因工程技术进行的小麦遗传转化,具有把外源基因主动导入、定向改造农艺性状的优点,解决了常规育种中的一些难题,打破了物种间遗传交流的限制,是产生新的小麦品种(系)和种质资源快捷有效的方法之一^[2]。通过基因枪法^[3]、PEG介导法^[4]、电击法^[5]、农杆菌介导法^[6]、花粉管通道法^[7]等各种遗传转化技术,已经获得了一些转基因小麦。自1997年Cheng等^[6]首次报道用农杆菌介导转化小麦幼胚和胚性愈伤组织,获得可育转基因小麦以来,农杆菌介导转化以其插入DNA片段明确、低拷贝、遗传及表达稳定等特点^[8,9],在小麦遗传转化中逐渐得到广泛应用。豇豆胰蛋白酶抑制剂(*CpTI*)属于Bowman-Birk型丝氨酸蛋白酶抑制剂^[10-12],来源于食用植物豇豆,对人畜无害,无潜毒,是一种天然的广谱高效抗虫蛋白,对鳞翅目、鞘翅目、直翅目等许多害虫有效;同时该抑制剂作用于昆虫保守的酶活性中心,昆虫突变产生适应性的可能性较小。因此,将*CpTI*基因导入小麦培养细胞,产生抗储粮害虫麦蛾(鳞翅目)、玉米象(鞘翅目)、谷蠹(鞘翅目)的转基因小麦,具有重要的理论和生产实践意义。

*CpTI*基因转化植物及转化后抗虫性鉴定,国内外已有大量报道^[13-16],但关于*CpTI*基因转化小麦的报道很少。2000年于晓红等^[17]通过基因枪将*CpTI*基因导入小麦胚性愈伤组织,经PCR检测获得再生转基因植株;再生植株可正常扬花,但失去了育性,没有后代产生。本文对影响小麦农杆菌介导转化的因素做了研究,并利用农杆菌介导将*CpTI*基因

导入小麦幼胚胚性愈伤组织,获得3株正常可育的转基因植株;对获得的转基因植株后代籽粒进行抗虫试验,结果证实转基因植株后代籽粒对麦蛾有很好的抗性。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料及培养基:以本实验室选育的冬性高代品系小麦幼胚愈伤组织为转化受体。该品系产量高、品质好、农艺性状优良,具有较高的幼胚组织培养再生能力^[18]。实验材料种植在本实验室试验田。

植物培养基采用固体形式,基本培养基:MS^[19]培养基附加水解酪蛋白(CH)200 mg/L、谷氨酰胺20mg/L、蔗糖30g/L、琼脂粉8g/L。愈伤组织诱导培养基:基本培养基附加2,4-D 2.0mg/L、脱落酸(ABA)0.1mg/L。再生培养基:基本培养基附加2,4-D 0.5mg/L、细胞分裂素(KT)0.1mg/L。筛选培养基:再生培养基附加卡那霉素(Km)50mg/L、头孢霉素(Cef)200mg/L。生根培养基:1/2MS培养基附加Cef 200mg/L。

农杆菌培养液为YEP培养液(酵母提取物10g/L、蛋白胨10g/L、NaCl 5g/L)附加利福平(Rif)25 mg/L、Km 50mg/L。

培养基成分除植物生长调节剂和抗生素外,按比例溶解混匀,组织培养培养基pH值调至5.8, YEP培养基pH值调至7.0~7.2,高压蒸汽灭菌121℃ 20min,待培养基温度降至40~50℃时过滤灭菌加入植物生长调节剂和抗生素。

1.1.2 菌株和质粒:根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为LBA4404,质粒为pROK-2,由中国科学院遗传研究所构建提供。质粒T-DNA区含有NPTⅡ基因和*CpTI*基因,*CpTI*基因由CaMV35S启动子启动调控。

1.1.3 酶、试剂、试剂盒及主要仪器:内切酶、Taq DNA聚合酶、dNTP、DNA分子量标准物购自宝生物工程(大连)公司;PCR扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;Hybond-N⁺尼龙膜购自Amersham公司;实时PCR反应试剂盒(LigheCycler FastStart DNA Master SYBR Green I),Southern blot杂

交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 1)购自Roche公司;常规试剂购自上海化学试剂有限公司;TaKaRa PCR仪由TaKaRa公司生产;实时PCR仪LightCycler 2.0由Roche公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 接种菌液的制备:取甘油保存的农杆菌菌液10 μ L加入到10mL YEP农杆菌培养液中,28 $^{\circ}$ C振荡(180r/min)过夜。取其中50 μ L加入到50mL YEP农杆菌培养液中,28 $^{\circ}$ C振荡(180r/min)培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$,将培养的菌液离心(12000r/min,4 $^{\circ}$ C,1min),收集菌体,用液体MS重悬并使重悬菌液 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$ 。

1.2.2 小麦幼胚愈伤组织的诱导:取小麦开花受粉后14~16d的幼粒,在70%(V/V)乙醇中浸泡1min,然后用0.01%(W/V)HgCl₂消毒15min,无菌蒸馏水冲洗3~5遍,剥取幼胚,置于愈伤组织诱导培养基上,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C暗培养20d,随时将萌发的芽切除。选取淡黄致密的胚性愈伤组织切块(直径约2~3mm)继代培养,20d继代1次。继代10d后,选取胚性愈伤组织作为转化的受体。

1.2.3 农杆菌转化小麦及植株再生^[20-22]:将胚性愈伤组织切成直径约2~3mm的小块,放置于附加乙酰丁香酮200 μ mol/L的再生培养基上,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C黑暗条件下预培养3d后,浸泡于新鲜配制的农杆菌重悬菌液($OD_{600} = 0.4 \sim 0.8$)中,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C黑暗条件下侵染60min。然后取出愈伤组织,用无菌滤纸吸去多余菌液,放置在液体再生培养基(附加乙酰丁香酮200 μ mol/L)浸润的滤纸上,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C黑暗条件下共培养3d。之后取出愈伤组织,用200mg/L的头孢霉素抑菌液浸泡2min,无菌水冲洗4~5次,置于筛选培养基上,(25 \pm 1) $^{\circ}$ C暗培养2周,随后进行16h/8h(光/暗)光照培养(光照强度为40 μ mol/(m²·s))。筛选培养共进行4周,待经过筛选分化出来的抗性绿芽长至3cm左右时,移至生根培养基。具有正常根系的再生植株长至6~8cm时,练苗1周,移栽,自然越冬生长至成熟。

1.2.4 转基因小麦的PCR、实时PCR及Southern blot检测:提取对卡那霉素具有抗性的再生植株、阴性对照植株叶片基因组总DNA,及阳性对照pROK-2质粒DNA^[23,24],第二年提取转基因植株T₁代个体叶片基因组总DNA,进行PCR反应^[25,26]。CpTI/PCR检测引物P1:5'-GATGATGGTGCTAAAGGTGT-3',P2:5'-CTTACTCATCATCTTCATCC-3'。预期扩增产物大小

为326bp。取40ng叶片基因组总DNA或10pg质粒DNA,在25 μ L反应体系中进行目的基因的Touchdown PCR扩增。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min,然后以95 $^{\circ}$ C变性1min,(68.5 \pm 0.5) $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,进行35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR产物用3.0%琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统检测。

实时PCR反应体系按试剂盒说明配制。反应及信号检测条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min后进行35个循环,每个循环95 $^{\circ}$ C变性20s,68 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸20s,变温速度为20 $^{\circ}$ C/s,在每个循环的72 $^{\circ}$ C延伸时进行荧光信号检测。融解分析设定为:95 $^{\circ}$ C 0s(变温速度为20 $^{\circ}$ C/s),65 $^{\circ}$ C 20s(变温速度为20 $^{\circ}$ C/s),95 $^{\circ}$ C 0s(变温速度为0.1 $^{\circ}$ C/s),在65~95 $^{\circ}$ C的融解过程中进行荧光信号检测。

取40 μ g叶片基因组总DNA,经BamH I 37 $^{\circ}$ C 12h完全酶切后,0.9%琼脂糖凝胶电泳16h(电压20V)分离酶切产物,然后将DNA转移到Hybond-N⁻尼龙膜上^[26]。以质粒DNA CpTI的扩增片段为模板,进行非放射性探针标记、杂交和检测。实验操作按试剂盒说明进行。

1.2.5 转基因小麦T₂代籽粒抗虫分析:单株收获转基因小麦T₂代籽粒,储存于尼龙网袋内,置于高温高湿(25~35 $^{\circ}$ C,相对湿度为60%~80%)的储藏室内,感染麦蛾(*Sitotroga cerealella* Olivier)。3个月后观察统计籽粒虫蛀情况。

2 结果与讨论

2.1 菌浓度、侵染时间及乙酰丁香酮对转化的影响

用农杆菌侵染幼胚愈伤组织,设计不同菌浓度及侵染时间的处理,共培养3d后在筛选培养基上筛选20d,统计抗性愈伤组织存活率,即愈伤组织的转化效率。结果表明(图1),菌浓度和侵染时间对抗性愈伤组织存活率有明显的影响。在菌浓度 OD_{600} 为0.2、0.4的两组实验中,幼胚愈伤组织在选择培养基上的存活率随侵染时间的延长呈增加趋势;而0.6、0.8两组实验,表现为先增加后降低,分别在60min、45min达到最大值30.2%和23.0%;1.0组则表现出整体降低的趋势。农杆菌接种侵染的过程是农杆菌侵入植物组织并吸附在植物细胞上的过程。菌浓度越高,侵染时间越长,农杆菌侵入植物组织并吸附在细胞上的数量越多;但同时,植物材料浸没在农杆菌菌液里,菌液环境(pH值、渗透压、氧气、菌的代谢物等)对植物造成的伤害越严重,愈伤组织的存

活率也越低。因此寻找适宜的菌浓度和侵染时间组合,是成功转化所必需的。本实验得到的优化组合为 $OD_{600} = 0.6$, 侵染 60min, 认为采用此菌浓度和侵染时间对于外植体的转化及生存均比较有利。

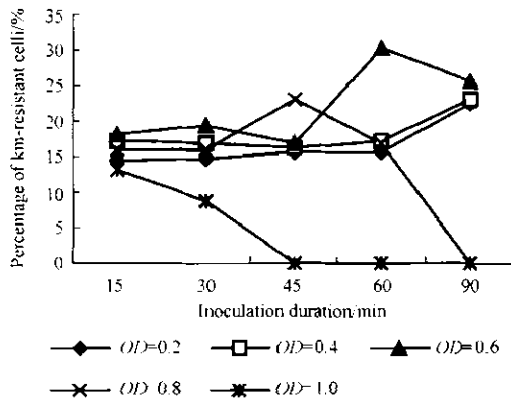


图1 菌浓度和侵染时间对愈伤组织转化率的影响

Fig.1 Effect of *A. tumefaciens* cell density and inoculation duration on efficiency of transformation

乙酰丁香酮(AS)是农杆菌介导转化的有效诱导物质,是禾谷类和其他单子叶植物遗传转化成功的必要条件之一。在农杆菌介导单子叶植物遗传转化成功的报道中^[27-29],均在转化过程中加入了适量的AS。本实验在农杆菌侵染愈伤组织前的预培养、农杆菌培养的最后30min以及侵染愈伤组织后的共培养三个阶段中,分别添加200 μ mol/L的AS,添加方式见表1。在侵染后20d统计抗性愈伤组织存活率。结果表明(图2),不同处理方式对抗性愈伤组织存活率有很大影响。处理1(40.0%)、处理2(24.5%)、处理3(36.5%)与对照处理5(21.4%)相比,在不同程度上提高了抗性愈伤组织的存活率,而处理4的存活率(13.3%)却低于对照水平。在愈伤组织预培养和共培养时加入AS,可提高转化率,而细菌培养时加入AS则会降低愈伤组织的转化效率,原因可能是,在预培养和共培养时加入AS提高了小麦愈伤组织中AS的含量,AS诱导侵入愈伤组织的农杆菌Vir基因的表达,进而提高了农杆菌对细胞的转化能力,增加了转化率。在细菌培养时加入AS会降低转化率,则可能是因为AS是一种酚类化合物,具有氧化作用,与细菌细胞直接接触,可影响细菌活性,降低转化效率。本文实验结果与前人在胡萝卜^[30]、苹果^[31]、西红柿^[32]、棉花^[33]等双子叶植物上的研究结果相一致。本研究表明,在小麦中利用AS提高转化效率,以在预培养和共培养过程中加入适量的AS为宜。

表1 5种添加乙酰丁香酮(AS)的处理方式

Table 1 Five methods of adding acetosyringone (AS)

Treatment	Pre-cultivation medium	Cultivation of <i>A. tumefaciens</i> in the last 30 min	Co-cultivation medium
1	+	-	+
2	+	-	-
3	-	-	+
4	-	+	-
5	-	-	-

+ , presence of 200 μ mol/L AS; - , absence of 200 μ mol/L AS.

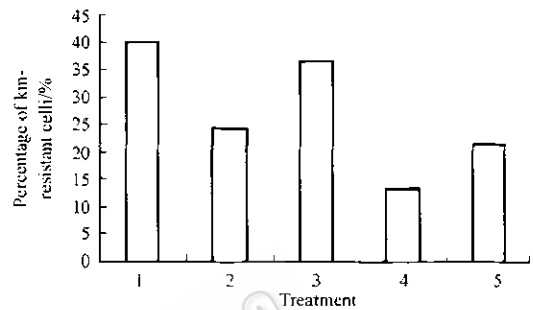


图2 乙酰丁香酮对愈伤组织转化率的影响

Fig.2 Effect of acetosyringone on efficiency of transformation

2.2 转基因植株的再生

侵染过的愈伤组织在筛选培养基上连续筛选4周后,将抗性愈伤组织或已分化的抗性绿芽原基、抗性绿芽转移至不含筛选剂的再生培养基上,继续分化培养。等到抗性绿芽长至3cm左右时,移至生根培养基。本实验对400块愈伤组织进行转化,得到48块抗性愈伤组织,获得3株生长正常能够开花结籽的转化植株,抗性愈伤组织获得率为12.0%,抗性愈伤组织再生率为6.25%,总体转化效率为0.75%。

农杆菌介导的小麦遗传转化受很多因素的影响,比如小麦的基因型、农杆菌菌株类型、菌浓度、预培养和共培养时间、侵染时愈伤组织的生理状态和发育时期、培养基成分、诱导物质的添加方式,以及筛选剂、抑菌剂和表达载体的类型等。为了获得较高的转化效率,每个影响因子必须选择合适的参数。本实验中CpTI通过农杆菌介导进入小麦培养细胞,从抗性愈伤组织中获得转基因小麦,转化中涉及到的几个主要因素小麦基因型^[18]、菌浓度、侵染时间、乙酰丁香酮的添加方式等被优化。但本文在转化植株再生中抗性愈伤组织再生率不高,远低于小麦幼胚离体再生体系建立时愈伤组织的再生率^[18],致使转化效率比较低,表明有关的转化参数需要进一步优化。

2.3 转基因植株 T₀ 代 CpTI 基因分子检测

提取 3 株转基因植株的基因组 DNA, 进行 Touchdown PCR 和实时 PCR 检测分析。结果如图 3、图 4 所示, 来自抗性愈伤组织的 3 株再生植株与质粒阳性对照, 有相同的 326bp 预期特异性条带和融解曲线; 而非转化阴性对照植株无 326bp 特异条带出现, 融解曲线为一条近似的直线。以标记的 CpTI

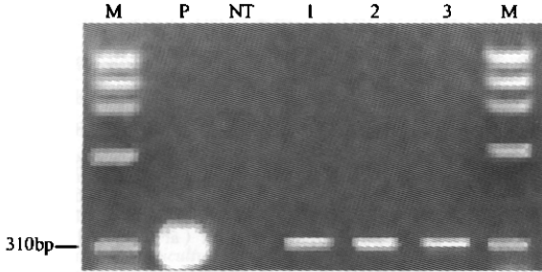


图 3 转基因 T₀ 植株 CpTI 基因 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of CpTI of the T₀ transgenic plants

M: ΦX174-*Hae* III digest DNA marker; P: PCR result of plasmid pROK-2; NT: PCR result of a non-transformed control; 1 ~ 3: PCR result of transformed plants.

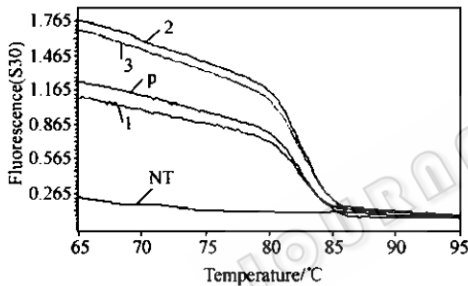


图 4 转基因 T₀ 植株 CpTI 基因实时 PCR 融解曲线

Fig.4 Real time PCR melting curves of CpTI of the T₀ transgenic plants

P curve: melting curve of PCR produce of plasmid pROK-2; NT: curve, melting curve of PCR produce of non-transformed control; 1 ~ 3 curves: melting curves of PCR produce of transformed plants.

基因作为探针, 对 PCR 产物进行 PCR-Southern blot 杂交, 进一步证明扩增出的特异带来自 CpTI 基因 (图未显示); 同时对酶切消化的基因组 DNA 进行 Southern blot 杂交 (图 5), 3 株再生植株各出现一条杂交带, 呈阳性反应, 而非转化植株无杂交带。以上结果证明 3 株被检植株为转 CpTI 基因植株, CpTI 基因已经以单拷贝的形式插入到这些转化植株基因组的位点。

2.4 CpTI 基因在 T₁ 代中的分离及 PCR 阳性个体农艺性状分析

转基因植株 T-I、T-II、T-III 分别结籽 230 粒、307 粒、187 粒, 每一株系随机选取 50 粒单株单盆种

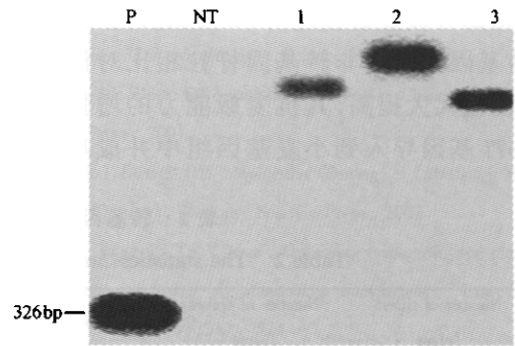


图 5 转基因 T₀ 植株 CpTI 基因 Southern blot 杂交分析

Fig.5 Southern blot analysis of CpTI of the T₀ transgenic plants

P: CpTI PCR-production of plasmid pROK-2; NT: genome DNA of non-transformed control; 1 ~ 3: genome DNA of transformed plants.

植, 提取叶片基因组 DNA, 进行 CpTI 基因 PCR 检测, 并在植株不同生长阶段进行 PCR 阳性个体农艺性状调查分析。转基因株系 T-I、T-II、T-III 的 T₁ 代群体中 PCR 阳性个体数与 PCR 阴性个体数之比分别是 1.94:1、0.75:1、2.13:1, χ^2 测验结果表明, 在株系 T-I 和 T-III 中, CpTI 基因按照孟德尔 3:1 分离比进行遗传 ($P > 0.05$); 而在株系 T-II 中, CpTI 基因的遗传不符合孟德尔规律 ($P < 0.05$)。

农艺性状调查结果 (表 2) 显示, 三个转基因植株 T₁ 代 PCR 阳性个体在分蘖数、成穗数、株高、穗长、小穗数、可育小穗数、穗粒数等几个农艺性状方面, 与非转基因植株相比, 具有很大的差异。分蘖数、成穗数、株高三个农艺性状有不同程度的降低, 而直接与产量有关的四个农艺性状穗长、小穗数、可育小穗数、穗粒数则有不同程度的增加。这可能是由于 CpTI 基因及相关片段的插入, 改变了转基因植株的遗传结构, 导致了一系列农艺性状的改变; 也可能是由于外源遗传物质的表达引起了转基因植株体内的某些生理变化而造成的。不同转基因株系之间相同的农艺性状表现出不同的变化程度, 可能是外源 DNA 片段在不同转基因植株中的插入位点不同形成的。

2.5 转基因小麦 T₂ 代籽粒抗虫分析

单株收获 T₁ 代 PCR 阳性个体种子, 在夏季普通储粮条件下感染麦蛾, 3 个月后调查种子虫蛀情况, 结果显示 (表 3), 非转基因对照植株种子麦蛾蛀食严重, 被蛀食的种子几乎成为空壳, 虫蛀率高达 58.3%; 而转基因株系 T-I、T-II、T-III T₂ 代籽粒麦蛾蛀食程度相对较轻, 虫蛀率为 19.8%、21.9%、32.9%, 分别下降了 66.04%、62.44%、43.57%, 与

对照相比有极显著性差异 ($P < 0.01$)。这一结果表明,转基因籽粒与非转基因籽粒相比对储粮害虫麦蛾的抗性大大提高,其抗麦蛾能力的增强可能是由于 *CpTI* 基因导入到小麦基因组中并成功表达的缘

故。而且实验中还发现不同的转基因株系之间表现出不同的抗麦蛾能力,这可能与该基因在不同转基因株系中的表达程度有关。

表 2 转基因植株 T₁ 代 PCR 阳性个体农艺性状统计分析

Table 2 The statistical analysis of agronomic traits of the T₁ PCR-positive individuals

Line	Number of tillers		Number of spikes		Height/plant (cm)		Length/spike (cm)		Number of spikelets		Number of fertility		Number of seeds/spike	
	/plant		/plant						/spike		spikelets/spike		spike	
	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P	Mean	P
T-I	12.18 ± 2.42	0.044	3.30 ± 0.92	0.000	79.00 ± 1.62	0.000	12.16 ± 0.65	0.000	20.40 ± 0.55	0.043	19.20 ± 0.84	0.023	57.80 ± 1.62	0.000
T-II	8.19 ± 2.10	0.000	4.20 ± 0.86	0.026	73.60 ± 1.88	0.000	13.78 ± 0.61	0.000	21.20 ± 1.30	0.004	20.20 ± 1.30	0.001	56.80 ± 1.30	0.000
T-III	10.30 ± 2.38	0.000	5.43 ± 1.43	0.542	82.70 ± 1.57	0.000	10.48 ± 0.62	0.250	19.20 ± 0.45	0.747	18.00 ± 0.71	0.520	40.60 ± 3.51	0.413
C	13.73 ± 1.90		5.18 ± 1.47		91.26 ± 2.17		10.06 ± 0.24		19.00 ± 1.22		17.60 ± 0.89		38.60 ± 3.91	

The statistical analysis used homogeneity test for variance, one-factor analysis of variance and Duncan multiple range test (at 0.05 and 0.01 level of probability). P, the value of probability of Duncan multiple range test between T₁ PCR-positive plants of T-I, T-II, T-III and the untransformed control plants respectively.

表 3 转基因小麦 T₂ 代籽粒抗虫分析

Table 3 The insect-resistance determination of T₂ seeds obtained from T₁ PCR-positive plants

Line	The ratio of seed moth-eaten mean	P
T-I	0.198 ± 0.260	0.000**
T-II	0.219 ± 0.265	0.000**
T-III	0.329 ± 0.299	0.002**
C	0.583 ± 0.325	

The statistical analysis used homogeneity test for variance, one-factor analysis of variance and Duncan multiple range test at 0.05 (*) and 0.01 (**) level. The results of P of T-I, T-II, T-III compared with the control respectively in Duncan multiple range test were only showed. The ratio of seed moth-eaten was calculated based on the number of seeds eaten by wheat moths out of the total number of the seeds per plant.

综合以上研究结果,笔者认为,经农杆菌介导获得了三个不同的转 *CpTI* 基因小麦株系; *CpTI* 基因在一定程度上能够增强转基因小麦籽粒抗储粮害虫麦蛾的能力。而对于其他鳞翅目、鞘翅目、直翅目的储粮害虫是否具有同样的抗性,还有待更进一步的研究。

REFERENCES (参考文献)

[1] Yuan F (袁锋). Agricultural Entomology, 3rd ed. In Beijing: Chinese Agriculture Press, 2001, pp. 392 - 394

[2] Lorz H, Becker D, Lütticke S. Molecular wheat breeding by direct gene transfer. *Euphytica*, 1998, 100: 219 - 222

[3] Vasil V, Castillo AM, Fromm ME et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Biol Technology*, 1992, 10: 667 - 674

[4] Xia GM (夏光敏), Chen HM (陈惠民), Cheng ZM (成卓敏) et al. Transformation of wheat protoplasts by BYDV CP gene and the regeneration of transgenic plants. *Journal of Shandong University (Nat. Sci. Ed.)* (山东大学学报)(自然科学版), 1996, 31(3): 357 - 360

[5] Sorokin AP, Ke XY, Chen DF et al. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci*, 2000, 156: 227 - 233

[6] Cheng M, Fry JE, Pang SZ et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 1997, 115: 971 - 980

[7] Hou WS (侯文胜), Guo SD (郭三堆), Lu M (路明). Development of transgenic wheat with a synthetical insecticidal crystal protein gene via pollen tube pathway. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, 29(6): 806 - 809

[8] Smith RH, Hood EH. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci*, 1995, 35: 301 - 309

[9] Dai S, Zhang P, Marmey P et al. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed*, 2001, 7: 25 - 23

[10] Hilder VA, Barker RF, Samour RA et al. Protein and cDNA sequences of Bowman-birk protease inhibitors from the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Plant Mol Bio*, 1989, 13: 701 - 710

[11] Ryan CA. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defense against herbivores. *Bio Essays*, 1989, 10: 20 - 24

[12] Liu CM (刘春明), Zhu Z (朱楨), Zhou ZL (周兆澜) et al. cDNA clone and expressing of cowpea trypsin inhibitor in *Escherichia coli*. *Chinese J Biotech* (生物工程学报), 1993, 9: 152 - 157

[13] Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE et al. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 1987, 330: 160 - 163

[14] Zhao RM (赵荣敏), Fan YL (范云六), Shi XP (石西平) et al. Highly insect-resistant transgenic tobacco plants containing both Bt and CpTI genes. *Chinese J Biotech* (生物工程学报), 1995, 11(1): 1 - 5

- [15] Xu DP, Xue QZ, David ME *et al.* Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene. *CpT I*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Mol Breed*, 1996, **2**:167 - 173
- [16] Tian YC (田颖川), Zheng JB (郑均宝), Yu HM (虞红梅) *et al.* Studies of transgenic hybrid poplar 741 carrying two insect-resistant genes. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 2000, **42**(3): 263 - 268
- [17] Yu XH(于晓红), Zhu Z(朱楨), Xu HH(徐鸿林) *et al.* Wheat transformation by microprojectile bombardment and transgenic wheat regeneration. *High Technology Letter* (高技术通讯), 2000, **2**: 13 - 17
- [18] Jia HY (贾海燕), Wang HG (王洪刚). Studies on factors influencing the induction and regeneration of wheat callus. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)* (山东农业大学学报·自然科学版), 2003, **34**(1): 9 - 14
- [19] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, **15**: 473 - 497
- [20] Amoah BK, Wu H, Sparks C *et al.* Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**: 1135 - 1142
- [21] Khanna HK, Daggard GE. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Rep*, 2003, **21**:429 - 436
- [22] Wu H, Sparks C, Amoah B *et al.* Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep*, 2003, **21**:659 - 668
- [23] Clark MS. *Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual*. Chinese ed, Beijing: China Higher Education Press and Spinger-Verlag Berlin Heidelberg, 1998
- [24] Wang GL (王关林), Fang HJ (方宏筠). *The Plant Genetic Engineering*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002
- [25] Harwood AJ. *Basic DNA and RNA Protocols*. Chinese ed, Beijing: Science Press, 2001
- [26] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed (Chinese), Beijing: Science Press, 2002
- [27] Yin ZC, Yang F, Xu Y *et al.* Obtaining transgenic rice plants and their progenies using *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Genetica Sinica*, 1998, **25**(6):517 - 524
- [28] Yu YZ(余云舟), Wang G (王罡), Jin NY (金宇一) *et al.* Transformation of type II calli of maize inbred lines mediated via *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Maize Sciences* (玉米科学), 2003, **11**(3):28 - 30,33
- [29] Xiao J (肖军), Shi TY (石太渊), Zheng XC (郑秀春) *et al.* Establishment of sorghum genetic transformation system with mediating *Agrobacterium tumefaciens*. *Rain Fed Crops* (杂粮作物), 2004, **24**(4):200 - 203
- [30] Guivarch A, Caissard JC, Brown S *et al.* Localization of target-cells and improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by direct acetosyringone pretreatment of carrot root disks. *Protoplasma*, 1993, **174**:10 - 18
- [31] James DJ, Uratsu S, Cheng JS *et al.* Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep*, 1993, **12**:559 - 563
- [32] Joao KHL, Brown TA. Enhanced transformation of tomato cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* c58c1rif^r/ pgsfr1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Rep*, 1993, **12**:422 - 425
- [33] Zheng SS (郑树松), An CC (安成才), Li QR (李启任) *et al.* The effect of acetosyringone on gene transformation of cotton hypocotyl. *Cotton Science* (棉花学报), 2003, **15**(2):125 - 126