

采用花粉管通道法将蛋白激酶基因导入 玉米自交系的研究

石 薇^{1,2}, 黄丛林¹, 张秀海¹, 吴忠义¹, 杨德光²

(1. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 通过花粉管通道法将 *ZmPti1*, *ZmPti1-I*, *ZmCIPK2* 三种蛋白激酶基因植物表达载体分别导入玉米自交系吉 444, 经草丁膦筛选后得 40 株抗性植株, 通过 PCR 检测其中 28 株为 PCR 阳性植株, 平均转化率为 1.33%, 最后收获 11 株转基因植株。干旱条件下通过对转基因 T_1 植株的单株籽粒产量、千粒重两个指标进行差异显著性和耐旱系数的分析, 结果表明 转基因植株与非转基因植株对干旱的敏感性不同, 初步认为转基因植株具有抗旱性, 表明蛋白激酶能够提高玉米的耐旱性。

关键词: 蛋白激酶; 花粉管通道法; 转基因玉米; 抗旱性

中国分类号: Q78; S513.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)04-0046-04

Studies on Transformation of Maize Inbred Line with Protein Kinase Genes by Pollen-tube-pathway

SHI Wei^{1,2}, HUANG Cong-lin¹, ZHANG Xiu-hai¹, WU Zhong-yi¹, YANG De-guang²

(1. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Three plant expression vectors harboring protein kinase genes of *ZmPti1*, *ZmPti1-I*, or *ZmCIPK2* were transferred into maize inbred line Ji 444 separately by pollen-tube-pathway, and 40 glufosinate-tolerant plants were obtained through herbicide screening, then 28 of them were confirmed positive by PCR analysis. The average transformation rate was 1.33%, and 11 transgenic lines were harvesting T_1 seeds. Control plants along with T_1 transgenic plants were cultivated under drought conditions, and the yield of each plant and 1000-grains weight were analysis, then their drought tolerance coefficient of T_1 transgenic lines was calculated, and the elementary results suggested that transgenic plants was more tolerant to drought stress than that of control plants, and protein kinase can improve the drought tolerance of maize.

Key words: Protein kinase; Pollen-tube-pathway; Transgenic maize; Drought tolerance

玉米是我国第三大粮食兼饲料作物, 在国民经济中占有极其重要的地位。干旱是制约我国粮食生产发展的主要因素, 据统计, 我国玉米种植面积的 2/3 为旱作玉米, 有资料表明在禾本科作物中玉米的耐旱性较差^[1], 为了提高玉米生产产量, 转基因技术是一种不可忽视的方法^[2]。其中花粉管通道法是一种不依赖于组织培养受体体系的遗传转化方

法, 该方法是以周光宇提出的 DNA 片段杂交假说为依据的, 是利用植物授粉后所形成的天然的花粉管通道, 经珠心通道, 将外源 DNA 携入胚囊, 这种方法具有操作简便、经济、育种时间短、无基因型限制等优点, 与常规育种紧密结合, 已成为一种颇有潜力的转化技术。自问世以来, 已在水稻、小麦、玉米、大豆、棉花、烟草和番茄等多种植物的遗传转化

收稿日期: 2011-05-14

基金项目: 国家转基因重大专项重点课题(2009ZX08003-009B); 北京市科委项目(Z090605006009014; Z09090501040902), 北京市农林科学院科研能力创新项目

作者简介: 石 薇(1985-), 女, 河北宣化人, 在读硕士, 主要从事玉米生物技术研究。

通讯作者: 吴忠义(1969-), 男, 福建德化人, 副研究员, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。

杨德光(1967-), 男, 湖北孝感人, 教授, 主要从事作物栽培生理研究。

中取得成功^[3]。1996 年祁永红^[4]报道了利用花粉管通道技术成功地将外源总 DNA 导入玉米自交系, 获得了具有广泛变异的不同类型的自交系。2001 年王景雪等^[5]用花粉介导法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米自交系, 获得转基因植株。2002 年王罡等^[6]将 Bt 基因通过花粉管通道法导入吉林省骨干玉米自交系。2008 年王秀君等^[7]将耐草甘膦基因 *mG2-ep-sps* 导入优良玉米自交系中。

蛋白激酶可以通过多重复杂的信号传递途径对干旱、高盐及低温等作出反应, 有研究表明在盐、ABA、低温等的诱导下, 蛋白激酶基因的表达量提高^[8,9], 这说明蛋白激酶能够响应逆境的诱导。目前人们对蛋白激酶的功能还不甚了解, 能否提高作物的耐旱性需进一步研究。本试验利用花粉管通道法将 3 种蛋白激酶基因转入到玉米自交系吉 444, 进一步探讨蛋白激酶基因的耐旱功能, 以期获得耐旱转基因玉米自交系, 为抗旱育种提供途径。

1 材料和方法

1.1 试验材料

玉米自交系吉 444 由东北农业大学农学院逆境实验室提供。表达载体 pBPC-ZmPti1、pGreen0229-ZmPti1-4、pGreen0229-ZmCIPK2 由北京市农林科学院生物中心花卉与重要经济植物研究室提供, 标记基因均为 *bar* 基因。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取 采用通宝达成科技(北京)有限公司的 NewBioIndustry 高纯度大提质粒试剂盒提取。提取后用 Eppendorf 核酸蛋白测定仪分析纯度和浓度, 以 ddH₂O 稀释质粒 DNA, 质量浓度为 150~190 μg/mL。

1.2.2 试验的时间和地点 试验于 2009 年 6~10 月在北京市农林科学院生物技术研究中心试验田播种、授粉、转化及收获 T₀ 种子; 2009 年 11 月到 2010 年 4 月海南播种、抗性筛选及收获 T₁ 种子; 2010 年 5~9 月底于北京市农林科学院生物中心塑料大棚进行 T₁ 抗旱性鉴定, 收获 T₂ 种子。

1.2.3 导入方法 选择玉米自交系吉 444 作为受体, 在开花期从受体自交系群体中选择发育正常的植株进行套袋自交。在授粉后 20~24 h 进行导入, 先将雌穗上的纸袋摘下, 用剪刀剪去大约距离穗轴顶端 1~2 cm 的花丝和苞叶, 保持花丝切面平齐, 并使苞叶内的花丝略高于苞叶。然后用移液枪在切口处滴入 100 μL 质量浓度为 150~190 μg/mL 的质粒溶液, 立即套上纸袋, 挂牌记录。授粉和转化最

好在晴天进行。待玉米果穗成熟时, 分别收获、晒干、脱粒。

1.3 转化植株的筛选

将收获的玉米 T₀ 种子全部播种到海南基地进行抗性筛选, 幼苗生长至 3 叶期时喷洒除草剂草丁膦, 喷洒浓度为 200 mg/L, 统计抗性苗数。

1.4 PCR 检测

对 T₀ 除草剂抗性植株在苗期进行 PCR 检测, 采用 CTAB 法提取叶片总 DNA, 运用引物设计软件 Primer Premier 5.0 以 *bar* 基因的 DNA 片段作引物, 用质粒 63℃ 退火 30 s, 7℃ 延伸 35 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。以 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 抗旱性初步鉴定

选取经 PCR 检测为阳性植株的 T₁ 种子播种于大棚(未遮棚膜)并设对照, 每个株系播 5 穴, 每穴 3 粒共 15 粒, 株距 30 cm 左右, 行距 60 cm 左右, 出苗后将大棚覆上棚膜, 于 4~5 叶期喷洒 150 mg/L 的草丁膦 2 次, 间隔 10 d。玉米生育期间在抽雄期浇水 1 次, 之后套袋自交授粉, 收获 T₂ 种子。收获后测定玉米各株系的单株籽粒产量和千粒重, 3 次重复, 取平均值, 并计算耐旱系数(DTC)^[10], 其中耐旱系数 = 干旱测定值/对照测定值。用 SPSS16 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 花粉管转化及转化植株的筛选

采用花粉管通道法共转化玉米自交系幼穗 24 穗, 到自然成熟时收获 18 穗玉米, 共获得 3 018 粒种子。同年冬季将收获的种子全部播种在海南基地, 待玉米幼苗生长至 3 叶期时喷洒 200 mg/L 的草丁膦进行抗性筛选, 筛选过程中绝大多数植株逐渐萎蔫、叶片发黄、死亡, 少部分植株表现为绿色, 能生长正常, 喷洒 7 d 后统计共有 40 株玉米幼苗生长正常, 表现出草丁膦抗性(表 1)。

2.2 转化植株的 PCR 检测

对筛选到的 T₀ 抗性植株进行 PCR 检测。PCR 扩增的引物为 *bar* 基因的上下游引物, 扩增产物大小为 550 bp 左右, 由于篇幅有限, 只列出部分检测结果(图 1), 在检测中抗性植株可以扩增出与质粒阳性对照大小一致的特异性条带, 而非转基因阴性对照则没有扩增出与质粒阳性对照大小一致的特异性条带。初步证明目的基因已被整合进基因组中。在检测的 40 株抗性植株中有 28 株为 PCR 阳性, 转化率为 1.33%, 最后收获 11 株转基因植株(表 1)。

表 1 玉米自交系吉 444 的转化结果
Tab. 1 The transformation result of maize inbred line Ji 444

| 基因 Genes | 转化穗数 No. of transforming spike | 收获穗数 No. of obtained spike | 收获粒数 (T_0) No. of obtained grain | 抗性株数 No. of glufosinate- tolerant plants | PCR 阳性株数 No. of PCR positive plants | 转化率/% Transforming rate | 收获种子转 基因株数 Transgenic plants of harvesting seeds |
|-----------------|---|-------------------------------------|--|---|---|-------------------------------|---|
| <i>ZmPtiI</i> | 9 | 7 | 827 | 11 | 6 | 1.04 | 2 |
| <i>ZmPtiI-I</i> | 9 | 7 | 1 336 | 15 | 12 | 1.28 | 8 |
| <i>ZmCIPK2</i> | 6 | 4 | 855 | 14 | 10 | 1.67 | 1 |
| 总计 Total | 24 | 18 | 3 018 | 40 | 28 | 1.33 | 11 |

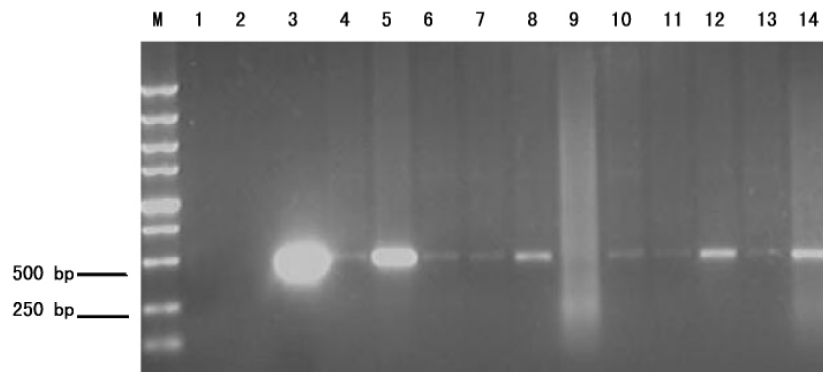
M. DNA marker; 1. 非转基因阴性对照; 2. 水空白对照; 3. 质粒阳性对照; 4~14. 转化植株。
M. DNA marker; 1. Non-transgenic plant; 2. Water; 3. Plasmid control; 4~14. Transformed plants.

图 1 部分抗性植株的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR identification of partial glufosinate-tolerant maize plants

2.3 玉米 T_1 的抗旱性初步鉴定

2.3.1 耐旱指标的差异显著性分析 将在海南收获的玉米自交系吉 444 T_1 的每个株系随机取部分种子在塑料大棚中进行抗旱性鉴定。表 2 所示的方差分析结果表明:与对照 CK 相比,编号为 4 和 9 的转基因株系的单株籽粒产量达到了极显著水平,编号为 1、3、8、10 差异不显著,其他株系的单株籽粒产量低于对照,原因可能包括天气高温干旱、玉米自身花粉质量低、花粉量少、人为因素、病虫害、种植的位置不同等因素。与对照 CK 相比,编号为 1、2、3、4、5、8、9、10 的转基因株系的千粒重达到了极显著水平,只有编号为 6 和 7 的株系差异不显著。编号为 4 和 9 的株系在单株籽粒产量和千粒重两个测定指标上都达到了极显著水平。

2.3.2 耐旱指标的耐旱系数的分级 本试验设计的干旱条件较为严格,单株籽粒产量是各种不同耐旱机制的一种综合表现,从表 2 中可以看出,编号为 3、4、9、10 的株系的耐旱系数在 2.00 以上,可以认为有强耐旱性;编号为 1、8 的株系的耐旱系数为 1.01~2.00,可以认为有耐旱性;编号为 2、5、6、7 的株系的耐旱系数在 1.00 以下,可认为不具耐旱性。千粒重能体现种子大小与饱满程度,可以检验种子质量,也是田间预测产量时的重要依据。从表 2 中可知,编号为 2、3、4、5、8、9 的株系的耐旱系数

在 2.00 以上,可以认为有强耐旱性;其他株系的耐旱系数为 1.01~2.00,可以认为具有耐旱性。总的来说编号为 1、3、4、8、9、10 株系具有耐旱性,说明转基因株系还是具有一定耐旱性的。图 2 为干旱条件下同一时期的非转基因植株与转基因植株的表型表现。

表 2 吉 444 T_1 转基因株系抗旱性鉴定初步结果
Tab. 2 Preliminary results of drought-tolerance of T_1 transgenic lines of maize Ji 444

| 编号 No. | 基因 Genes | 单株籽粒产量/g Yield per plant | | 千粒重/g 1000-grains weight | |
|-----------|-----------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| | | 干旱 Drought | 耐旱系数 DTC | 干旱 Drought | 耐旱系数 DTC |
| 0 | CK | 11.79 | | 88.861 | |
| 1 | <i>ZmPtiI</i> | 21.79 | 1.848 | 174.32** | 1.962 |
| 2 | <i>ZmPtiI-I</i> | 8.65 | 0.734 | 200.38** | 2.255 |
| 3 | <i>ZmPtiI-I</i> | 29.89 | 2.535 | 192.85** | 2.170 |
| 4 | <i>ZmPtiI-I</i> | 56.28** | 4.774 | 187.59** | 2.111 |
| 5 | <i>ZmPtiI-I</i> | 5.20 | 0.441 | 262.33** | 2.952 |
| 6 | <i>ZmPtiI-I</i> | 4.37 | 0.371 | 133.88 | 1.507 |
| 7 | <i>ZmPtiI-I</i> | 6.92 | 0.587 | 132.63 | 1.493 |
| 8 | <i>ZmPtiI-I</i> | 22.38 | 1.898 | 229.25** | 2.580 |
| 9 | <i>ZmPtiI-I</i> | 52.07** | 4.416 | 195.19** | 2.197 |
| 10 | <i>ZmCIPK2</i> | 32.50 | 2.756 | 176.69** | 1.988 |

注: ** 表示在 0.01 水平与对照存在极显著差异。

Note: **. Mean significant at 0.01 level between transgenic lines and control.



A. 非转基因植株; B. ZmPti1-1 转基因植株。

A. Non-transgenic plants ; B. Transgenic plants of ZmPti1-1.

图 2 同一时期的非转基因植株与转基因植株的表型

Fig. 2 Phenotype of non-transgenic and transgenic plant in the same stage

3 讨论

应用于玉米遗传转化的方法很多,如基因枪法、农杆菌介导法、超声波介导法、子房注射法等,且均取得了较满意的效果^[11-18]。其中花粉管通道法既经济又简单,便于大规模基因转化,可以在任何开花植物和不同物种之间实现基因的转移。该方法转化成功与否决定于经花粉管进入胚囊的外源 DNA 能否参与受精,研究表明,玉米的花粉管伸入子房及双受精过程发生在授粉后 20~24 h^[19],一般认为该期间进行外源 DNA 的导入比较适宜。本试验选取玉米自交系吉 444,授粉时间大概为 11:00,在授粉后 20~24 h 导入外源基因,筛选后的抗性植株经 PCR 检测转化率为 1.33%,在花粉管的一般转化率 1.0%~10.0%^[20]。花粉管通道法转化率大小可能与玉米基因型、外源 DNA 片段的大小、DNA 的纯度和浓度、导入量、授粉时的天气情况等有关,需要进一步研究。蛋白激酶基因能够参与逆境的信号转导,但蛋白激酶的功能尚不清楚。本试验通过对获得的转基因植株 T₁ 进行抗旱性的鉴定,结果表明转基因植株表现为一定的抗旱性,表明了蛋白激酶基因能够响应干旱胁迫诱导,表现为提高玉米耐旱性。

参考文献:

- [1] Bolaños J, Edmeades G O. Value of selection for osmotic potential in tropical maize [J]. *Agronomy Journal*, 1991, 83: 948-956.
- [2] 李长缨,简元才. 花粉管通道法在植物遗传转化中的应用[J]. *生物学杂志* 2000, 17(1): 9-10.
- [3] 王永锋,栾雨时,高晓蓉. 花粉管通道法在植物转基因中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2004, 35(6): 764-768.
- [4] 祁永红. 玉米自交系授粉后外源 DNA 的导入转化及性状变异的研究初报[J]. *玉米科学*, 1996, 4(1): 19-21.
- [5] 王景雪,孙 毅,崔贵梅,等. 花粉介导法获得玉米转基因植株[J]. *植物学报*, 2001, 43(3): 275-279.
- [6] 王 罡,张艳贞,魏松红,等. 花粉管通道法将 Bt 毒蛋白基因导入优良玉米自交系[J]. *吉林农业大学学报*, 2002, 24(1): 36-37.
- [7] 王秀君,郎志宏,陆 伟,等. 利用花粉管通道法将耐草甘膦基因 mG2-epsps 导入玉米自交系的研究初报[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(4): 56-62.
- [8] Zou H W, Wu Z Y, Yang Q *et al.* Gene expression analyses of ZmPti1, encoding a maize Pti-like kinase suggest a role in stress signaling [J]. *Plant Science*, 2006, 171(1): 99-105.
- [9] 边鸣镝,吴忠义,张秀海,等. 玉米蛋白激酶基因 ZmPti1-1 的 cDNA 克隆及其表达特性[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 36-40.
- [10] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:中国农业出版社, 1992: 131-105.
- [11] 袁 英,李启云,孔祥梅,等. 转双价抗虫基因 Bt-*pta* 玉米植株的获得[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(10): 131-134.
- [12] 王国英,杜天兵,张 宏,等. 用基因枪将 Bt 毒蛋白导入玉米及转基因植株再生[J]. *中国科学: B 辑*, 1995, 25(1): 71-76.
- [13] 张艳贞,王 罡,胡汉桥,等. 农杆菌介导将 Bt 杀虫蛋白基因导入优良玉米自交系的研究[J]. *遗传*, 2002, 24(1): 35-39.
- [14] Huang L, Wei Z M. *Agrobacterium tumefaciens* mediated maize transformation [J]. *Acta Biol Exp Sin*, 1999, 32(4): 381-389.
- [15] 张 宏,王国英,谢友菊,等. 超声波介导法转化玉米愈伤组织及可育转基因植株的获得[J]. *中国科学: C 辑*, 1997, 27(2): 162-167.
- [16] 丁群星,谢友菊,戴景瑞,等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米[J]. *中国科学: B 辑*, 1993, 23(1): 707-713.
- [17] 王永芳,张 军,崔润丽,等. 利用花粉管通道转化谷子 DNAj 基因获得转基因小麦[J]. *华北农学报*, 2009, 24(2): 17-21.
- [18] 张森燕,吴忠义,张秀海,等. ZmPti1 基因正义和 RNAi 表达载体的构建及其转化玉米的研究[J]. *华北农学报* 2008, 23(5): 1-5.
- [19] 王艳杰,申家恒. 花粉管通道法转基因技术的细胞胚胎学机理探讨[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(3): 628-634.
- [20] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2002: 481-496.