

农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化新体系的建立

王昌涛¹, 赵玉锦², 李坤远¹, 张世煌²

(1. 北京工商大学, 北京 100037; 2. 中国农业科学院作物科学所玉米研究中心, 北京 100081)

摘要: 本研究借鉴经典农杆菌介导法, 成功地建立了一个农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化新体系。转基因植株经PCR, PCR-Southern, RT-PCR 分子检测, 结果表明外源目的基因已被插入玉米染色体基因组中, 并在转录水平上表达。采用此方法可省去组织培养过程, 取材方便, 可操作性强。

关键词: 农杆菌; 玉米; 萌动胚; 遗传转化

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)05-0110-04

The Establishment of a New Genetic Transformation System by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in Germinating Embryo of Maize

WANG Chang-tao¹, ZHAO Yu-jin², LI Kun-yuan¹, ZHANG Shi-huang²

(1. Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China;

2. CAAS, The Institute of Crop Sciences, Maize Research Center, Beijing 100081, China)

Abstract: A new genetic transformation system by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in germinating embryo of maize was established. The result showed that integration of foreign gene into the genome of transgenic maize plants was confirmed by PCR, PCR-Southern and RT-PCR analysis. The foreign gene was expressed at transcription level. According to this method, the procedure of plant tissue culture was avoided and the germinating embryo of maize was obtained conveniently. It will provide an efficient way for genetic transformation of maize.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; Maize; Germinating embryo; Genetic transformation

玉米是重要的粮食作物之一, 在粮食生产中占有极为重要的地位^[1]。为了提高玉米的产量和改善玉米的品质, 国内外众多学者利用转基因技术把外源基因转入玉米中。农杆菌介导的遗传转化方法具有能够转移较大片段的DNA, 外源基因重排少且多以单或寡拷贝的形式整合等优点, 因此农杆菌介导的植物基因转化是比较理想的方法^[2]。选择和建立良好的植物受体系统是基因转化能否成功的关键因素之一。迄今已建立了多种有效的受体系统(如原生质体, 愈伤组织等), 但是受体系统的建立要经过繁琐的植物细胞及组织培养过程^[3,4]。为了寻求更加快捷方便的转化方法, 本研究借鉴经典农杆菌介导方法, 以玉米萌动成熟胚为转化受体, 成功建立了农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化体系, 获得了转基因植株。经分子检测证明外源基因已整合进转基因

玉米基因组中, 而且在转录水平上表达。应用该转化体系, 可以省去大量繁琐的组织培养过程, 且取材方便不受时间的限制, 可操作性强。现将本试验方法介绍如下。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

根癌农杆菌为 C58C1 和 LBA4404, 所用的植物表达载体为 pCambia-1300。选择标记基因为潮霉素基因并且带有目的外源基因片段。

1.2 试验材料

本试验所用材料玉米自交系 R18 红系四川农业大学提供。

1.3 萌动胚制备

玉米种子用 70% 酒精浸泡 10 min, 0.1% 升汞消

收稿日期: 2007-04-30

基金项目: “948” 资助项目 (2003-3Q)

作者简介: 王昌涛 (1975-), 男, 山东菏泽人, 讲师, 博士, 主要从事生物工程方面的研究

通讯作者: 张世煌 (1948-), 男, 北京人, 研究员, 博士生导师, 主要从事玉米遗传育种工作。

毒 10 min, 无菌水冲洗 3~ 5 次, 在超净台里用解剖刀在玉米胚上小心的划开约 1~ 3 mm 的口子, 然后将种子浸泡在无菌水中, 置于 37 ℃ 水浴中约 4~ 5 h, 备用。

1.4 农杆菌介导玉米萌动胚转化

从平板中挑取单菌落 C58C1 或 LBA 4404(携带质粒 pCAMBIA- 1300) 接种到 5 mL YEB 液体培养基中, 28 ℃, 220 r/ min 振荡培养至对数生长期, 离心后重悬菌体。重悬菌体按 1: 50 的比例加入新的 YEB 液体培养基。把准备好的玉米萌动胚放入 YEB 液体培养基中, 28 ℃, 220 r/min 继续振荡 24 h, 然后把种子放在 MS 固体培养基上共培养 3 d, 再转入带有潮霉素的筛选培养基 7~ 10 d, 经过筛选后的幼苗移栽到温室中。

1.5 转基因植株的分子检测

1.5.1 PCR 检测 取抗性再生植株和未转化植株叶片, 微量法提取基因组 DNA, 根据外源基因的序列设计 PCR 引物进行扩增^[5]。

1.5.2 PCR-Southern 检测 参照文献[6], 以载体质粒的 PCR 产物作为阳性对照, 利用转基因植株的 PCR 产物进行转膜, 与标记的探针杂交(标记探针选用 TakaRa 公司 DNA Tabling Kit)。

1.5.3 RT-PCR 检测 分别提取转基因和未转基因植株的总 RNA, 利用 Promaga 公司的反转录试剂盒, 把 RNA 转录成单链 cDNA, 依次为模板, 用扩增外源基因的引物进行扩增, 进行凝胶电泳鉴定。

2 结果与分析

2.1 影响农杆菌转化玉米萌动胚的因素

为了提高农杆菌转化玉米萌动胚的转化率, 我们对转化过程中潮霉素筛选浓度, 不同菌株和乙酰丁香酮(AS) 对转化的影响, 浸染时间和划胚深度对转化的影响等几个因素分别进行了研究。

2.1.1 潮霉素筛选浓度的确定 本试验中构建的植物表达载体质粒 pCAMBIA-1300 的 T-DNA 区含有潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase, HPT) 基因, 因此我们用不同浓度潮霉素进行了抗性筛选试验。潮霉素浓度太低容易出现假阳性植株, 浓度过高则影响植物的正常生长发育。我们分别选择含有 0, 25, 50, 75, 100 mg/L 潮霉素浓度的 MS 培养基, 每种浓度培养基中接种 100 粒玉米种子, 进行浓度梯度试验。结果见表 1。

从表 1 可以看出, 当潮霉素浓度为 75 mg/L 时, 基本上玉米种子都丧失了发芽能力, 由于划胚的深度和其他因素的影响, 对照的种子发芽率也大大下

降, 综合考虑各种因素, 我们选择了 50 mg/L 作为抗性筛选浓度, 这样既可避免假阳性植株的再生, 又可使抗性植株正常发育生长。

表 1 培养基中不同浓度潮霉素对玉米种子发芽率的影响

Tab.1 The influence of hygromycin concentration on germination rate of maize seeds					
潮霉素浓度/(mg/L) Hygromycin concentration	0	25	50	75	100
种子发芽率/% Gemmination rate	78	23	1	0	0

2.1.2 菌株和 AS 对转化率的影响 我们对不同菌株和乙酰丁香酮(AS) 对转化率的影响进行了研究。我们设计了两组试验: (1) 在 C581 和 LBA4404 农杆菌浸染液和共培养基中加入乙酰丁香酮(AS), (2) 在 C581 和 LBA4404 农杆菌浸染液和共培养基中不加乙酰丁香酮(AS), 用 (1)、(2) 两组试验分别浸染玉米萌动胚并进行共培养。

试验结果表明, 在相同试验条件下菌株 C58C1 与 LBA 4404 相比具有更强的浸染(表 2)。在菌液和共培养基中加入 AS, 可以提高转化率得到更多的抗性植株(表 3)。

表 2 不同菌株对玉米转化率的影响

Tab.2 The influence of different Agrobacterium tumefaciens strain on maize transformation rate		
菌株 Agrobacterium tumefaciens strain	C58C1	LBA4404
每千粒种子获得抗性苗数 Resistant plants getting from one thousand seeds	24	19

表 3 乙酰丁香酮(AS) 对玉米转化率的影响

Tab.3 The influence of AS on maize transformation rate during infecting and co-cultivation		
菌株 Agrobacterium tumefaciens strain	C58C1	
	加入 AS	不加 AS
每千粒种子获得抗性苗数 Resistant plants getting from one thousand seeds	28	11

2.1.3 浸染时间和划胚深度对转化的影响 我们对浸染时间和划胚深度对转化率的影响进行了研究。我们分别采用 6, 12, 18, 24, 32 h 浸染玉米萌动胚, 经共培养和抗性筛选后统计抗性植株数。

从表 4 可以看出浸染时间是影响转化率的一个重要因素。浸染时间过长过短都不利于萌动胚的转化, 浸染 24 h 转化率最高。在试验操作中我们发现划胚不能太深, 否则将影响转化效果。

2.2 转基因植株 T₀ 的分子检测

萌动胚在抗性筛选培养基上培养 7~ 10 d 后, 移栽到花盆置温室中, 幼苗成活后提取 DNA 和 RNA 进

行分子检测。本研究共转化玉米萌动胚 4 000 个, 获得抗性植株 91 株, 移栽后成活 58 株, 经 PCR 检测获得 11 株阳性植株, 现有 6 株阳性植株已经结实。

表 4 浸染时间对玉米转化率的影响

Tab.4 The influence of infecting time on transformation rate of maize seeds					
浸染时间/h Infecting time	6	12	18	24	30
每千粒种子获得抗性苗 Resistant plants getting from one thousand seeds	9	14	20	29	21

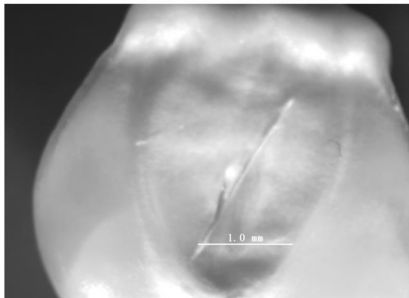


图1 划胚
Fig.1 Cut embryo

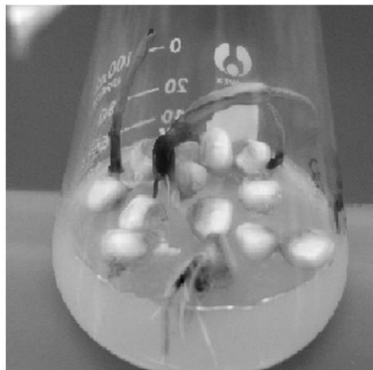


图 2 在筛选培养基上的成熟胚
Fig.2 Embryo on selection medium

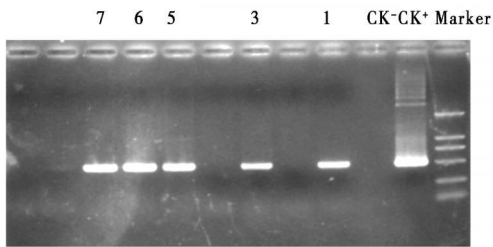


图 3 转基因植株的 PCR 检测
Fig.3 Identification by PCR of transgenic plants

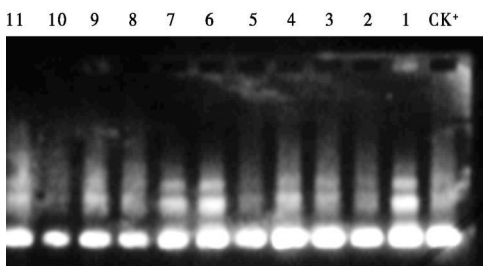


图 4 转基因植株的 PCR-Southern 检测
Fig.4 Identification by PCR-Southern of transgenic plants

通过对转基因植株 T₀ 的分子生物学检测, 证明外源基因已经转入到 T₀ 植株中, RT-PCR 检测结果表明外源基因在 RNA 水平上也有表达。

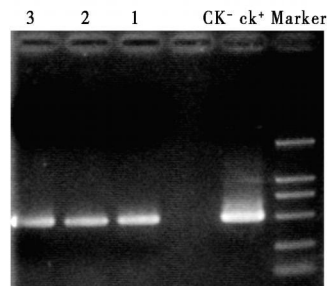


图 5 转基因植株的 RT-PCR 检测
Fig.5 Identification by RT-PCR of transgenic plants

3 讨论

转化体种胚是一幼小植物雏形, 具有天然形态建成能力。吸水种子胚内的酶活动加强, 呼吸作用骤然上升, 糖类、蛋白质以及核酸的合成和转变也迅速的进行。此时萌动种胚对外界因子的作用十分敏感, 胚性细胞开始处于分裂状态, 子叶对胚芽的包裹不再严密。此时利用高活力的农杆菌浸染萌动胚进而与之共培养^[7, 8], 将有利于对种胚生长点的转化。萌动种胚的微伤处理有利于农杆菌附着和进入宿主细胞。乙酰丁香酮(AS)可诱导 TI 质粒 VIR 区基因活化。总之, 高的转化率得益于农杆菌生物转化, AS 的诱导及萌动胚感受态这三者综合作用的结果。

本研究通过农杆菌介导法转化玉米萌动胚, 获得了转基因植株, 并在转录水平上表达。农杆菌介导植物基因转化是较为普遍的方法, 但是受体系统的建立要经过繁琐的植物细胞及组织培养过程且耗时费工。利用萌动胚作为转化的受体, 可以很快得到转基因植株, 试验操作相对简单, 对试验条件要求不是很高, 不依赖组织培养技术, 是非常方便可行的遗传转化方法。

本方法同其他直接转化方法的比较也有一定的优势, 玉米遗传转化中基因枪法应用比较广泛, 但是存在着拷贝数多, 遗传不稳定等缺点, 另外基因枪转化法价格较贵。其他花粉管通道法介导基因转化、胚囊、子房注射法介导基因转化在玉米遗传转化过程中也有应用, 但是这些方法转化机理不明确, 转化效率很低, 随着农杆菌介导法研究的深入和方法的逐渐成熟, 采用这些方法进行玉米遗传转化也逐渐减少。

本转化方法受到诸多因素的影响, AS 可以提高转化率。浸染时间最好控制在 24 h 左右, 时间太短

则使转化效率降低, 过长将影响种子的萌发, 幼苗生长弱, 移栽后很难成活。划胚的深度对转化也有很大影响, 切的过深会使胚丧失活性, 而过浅则减少农杆菌感染的机会。

虽然这种转化方法具有很多优点, 但是也存在一些问题, 这种方法的转化植株可能是嵌合体, 不会稳定的进行遗传, 需要进一步研究。同时这种方法的转化效率还是比较低, 我们转化了几千粒种子仅仅得到不足十棵可育阳性植株, 需要继续研究影响转化的因素, 提高转化效率。

参考文献:

[1] 周洪生. 玉米种子大全[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[2] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[3] Smith R, Hood E E. *Agrobacterium* of monocotyledons[J]. *Crop Science*, 1995, 35: 301–309.

[4] Miller I, Tagliani L, Wang N, *et al.* High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system[J]. *Transgenic Res*, 2002, 11(4): 381–396.

[5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[J]. 北京: 科学出版社, 2002.

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed[M]. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring harbor, New York, 1989.

[7] 许耀, 王艇, 李宝健. 根癌农杆菌介导的外源基因转化植物萌动胚的研究[J]. *实验生物学报*, 1993: 1–6.

[8] 杨剑波, 许智宏, 卫志明, 等. 影响根癌农杆菌附着禾谷类作物培养细胞的因素[J]. *实验生物学报*, 1993: 1–6.

《腐植酸》杂志 2008 年征订启事

《腐植酸》杂志于 1979 年创刊, 由中国腐植酸工业协会主办, 是全国惟一的腐植酸类专业科技期刊, 面向国内外公开发行人。《腐植酸》杂志是《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》入编期刊; 在“第六届全国石油和化工行业优秀期刊评选活动”中荣获专业技术类优秀期刊。本刊为国际标准大 16 开, 内设 60 页, 主要栏目有: “卷首语”、“专题评述”、“研究论文”、“译文”、“腐植酸质量检测”、“协会(专业)标准讨论”、“腐植酸文摘”、“腐植酸专利简介”、“腐植酸环保应用”、“‘两会’动态”、“信息传真”、“‘乌金杯’采风”等。

《腐植酸》杂志集学术性、专业性和实用性于一身, 内容广泛、指导性强、信息量大, 自 1979 年创刊以来, 受到广大读者的关注与好评。2008 年, 本刊将调整栏目内容, 增设新栏目, 以丰富杂志内容、增加行业信息量, 更好地为发展我国腐植酸事业做好服务工作!

本刊为双月刊, 国际刊号: ISSN1671–9212; 国内刊号: CN11–4736/TQ。每期定价 15.00 元(含邮费), 全年 6 期, 年定价 90.00 元(含邮费)。

2008 年《腐植酸》杂志征订工作已经全面展开, 热诚欢迎各位新、老读者及时订阅! 如需要 2007 年以前(包括 2007 年)的刊物, 请直接与编辑部联系。

订购方式: 从邮局汇款至编辑部:

地 址: 北京市西城区六铺炕街 1 号《腐植酸》编辑部收 邮 编: 100011

电 话: 010–82032432(兼传真)

E-mail: chaia@126.com

网 址: www.chinaha.org