

技术与方法 Techniques and Method

根癌农杆菌介导GUS基因转化玉米芽尖生长点的研究

邢小龙¹, 常纪莘¹, 付忠军², 胡德升¹, 杨慧丽¹, 付小康¹, 钟立华¹, 胡彦民^{1*}¹河南农业大学农学院/河南粮食作物协同创新中心, 郑州450002; ²重庆市农业科学院, 重庆401329

摘要: 本试验以玉米(*Zea mays*)杂交种‘郑单958’的芽尖生长点作为农杆菌侵染受体, 以 β -葡萄糖醛酸苷酶基因(*GUS*)作为转化基因, 吸水链霉菌草丁膦乙酰转移酶基因(*bar*)作为筛选标记基因, 通过*GUS*颜色反应, 分别从侵染液浓度、侵染时间和真空处理时间三个方面分析了影响*GUS*基因转化率的因素, 初步得出结论: 当侵染液浓度(OD_{600})为0.6、侵染时间2 h、真空处理时间为10 min时, 选用杂交种‘郑单958’作为受体材料将会达到较高的遗传转化率。

关键词: 玉米; 芽尖生长点; *GUS*基因; 根癌农杆菌; 遗传转化

玉米是重要的粮食、饲料及能源作物, 在我国农业生产中占有举足轻重的地位。玉米种质资源创新是品种改良的基础。转基因技术可以打破物种界限, 进行基因的定向改造, 为玉米种质资源创新及品种改良奠定基础。玉米的遗传转化方法主要有聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导法、农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法和合子转化法等(关红颖2011), 目前以农杆菌介导法和基因枪法为主(袁鹰等2006)。在玉米转化过程中, 受体材料的选择往往会影响到最终的转化效率, 是决定转化成功与否的关键因素之一, 因此选择合适的外植体作为农杆菌转化的受体, 建立不受基因型限制、高效的遗传转化体系是转基因生物技术工作者的目标(陈莉等2006)。本研究以玉米芽尖生长点为转化受体, 以 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase, *GUS*)基因为报告基因, 通过*GUS*基因的表达情况探索玉米遗传转化的条件, 为利用基因工程等技术对玉米品质改良提供理论参考。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 植物材料

本研究所用的试验材料为玉米(*Zea mays* L.)杂交种‘郑单958’(‘郑58’ \times ‘昌7-2’), 由本实验室保存。

1.2 植物表达载体

植物表达载体为pCAMBIA3301, 含报告基因*GUS*和除草剂筛选标记基因吸水链霉菌草丁膦乙酰转移酶(*Streptomyces hygroscopicus* phosphinothricin acetyltransferase, *bar*)基因(图1), 由本实验室保存。

1.3 农杆菌菌株

试验所用根癌农杆菌[*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Town.) Conn.]菌株为EHA105, 由本实验室保存。

2 方法

2.1 外植体的准备

挑选整齐饱满的玉米杂交种‘郑单958’的种子, 分别用0.1% (*m/V*)氯化汞溶液和75% (*V/V*)乙醇溶液消毒10 min, 用无菌水冲洗3~5次, 种子在1.5倍种子体积的无菌水中浸泡8 h。之后, 将种子平铺在萌发盘上, 底部垫上湿润的毛巾, 25°C黑暗条件萌发35~40 h。种子露白后, 在超净工作台上, 用手术刀剥去种皮和部分子叶, 再剥去1/4胚芽鞘, 剥开3~4片胚叶, 备用。

2.2 农杆菌转化

2.2.1 侵染菌液的准备

将含有表达载体的农杆菌在含利福平(50 $mg \cdot L^{-1}$)和卡那霉素(50 $mg \cdot L^{-1}$)的YEP液体培养基中28°C、200 $r \cdot min^{-1}$ 震荡培养20 h, 室温下10 000 $\times g$ 离心4 min收集菌体。用1/2MS液体培养基重悬菌体, 制备侵染液, 向侵染液中加入浓度为100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)和0.05% (*V/V*)表面活性剂Silwet L-77。

2.2.2 外植体的侵染

将准备好的玉米外植体置于侵染液中, 侵染液 OD_{600} 值分别调整为0.2、0.4、0.6、0.8和1.0, 在

收稿 2016-02-16 修订 2016-03-14

资助 国家自然科学基金(31071431)。

* 通讯作者(E-mail: huyanmin007@163.com)。



图1 pCambia3301质粒图谱

Fig.1 The plasmid map of pCambia3301

50 kPa压力下分别处理5、10和15 min。侵染时间分别设置为0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 h。

2.3 转化植株的获得

外植体侵染后,用清水反复冲洗5~6次,将其放在萌发盘中,底部垫有湿润的毛巾,48 h后种子胚根长到一定长度、胚芽长约1.5~2 cm时,将其播种在穴盘内。当幼苗长到三叶期时,喷洒0.2% (*m/l*)草丁膦(phosphinothricin, PPT)溶液进行筛选,筛选后所得抗性植株移栽至大田生长。

2.4 GUS基因表达检测

PPT筛选所得植株移栽至大田生长,对植株进行自交授粉,授粉后15 d,取部分植株幼胚做GUS染色,统计GUS基因表达率,分析不同的侵染液浓度、侵染时间和真空处理时间对GUS基因表达率的影响。

GUS 基因表达率=能够染上色的幼胚数/处理的幼胚总数 $\times 100\%$

2.5 转化植株的PCR检测

对GUS染上色的植株,提取叶片总DNA,然后进行PCR分子检测。引物序列为正向5'-AT-TCAGTCTGGATCGCGAAA-3',反向5'-TCCAGC-GTTTTTGCAGCAGA-3'。

PCR反应程序为95°C预变性3 min; 95°C变性45 s, 58°C退火45 s, 72°C延伸1 min; 36个循环后, 72°C延伸10 min。

PCR产物用1% (*m/l*)的琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像记录仪记录试验结果。

实验结果

1 侵染液浓度对GUS基因表达率的影响

由图2可知,随着侵染液浓度的增大GUS基因表达率表现出迅速上升随后又缓慢下降的趋势,当侵染液浓度(OD_{600})为0.6时GUS基因表达率达最大值2.2%。这种现象的原因可能是当把外植体浸入到农杆菌侵染液时,种子表面会吸附农杆菌,侵染液浓度越高吸附的数量越多,然而每个细胞所能承受的农杆菌数量是有限的,过多的农杆菌反而会对外植体细胞造成毒害作用,进而影响到GUS基因的表达率。

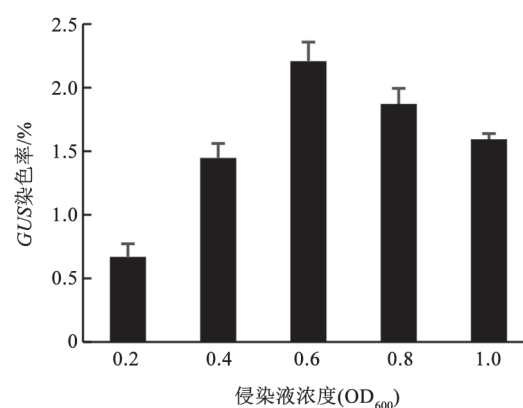


图2 侵染液浓度对GUS染色率的影响

Fig.2 Effect of bacterial concentration on GUS expression efficiency

2 侵染时间对GUS基因表达率的影响

由图3可知,随着侵染时间延长GUS基因表达率先上升随后下降,当侵染时间为2 h时GUS基因表达率达到最高为2.09%。很多研究(余云舟等2003; 秦新民等2011; 孙传波等2012)表明侵染时间长短对转化率的影响最为重要。这种现象的原因可能是GUS基因所在的T-DNA区从农杆菌细胞转移至玉米外植体细胞需要一定的时间,侵染时间过长T-DNA没有足够时间转移,转化率降低,进而影响GUS基因表达率。

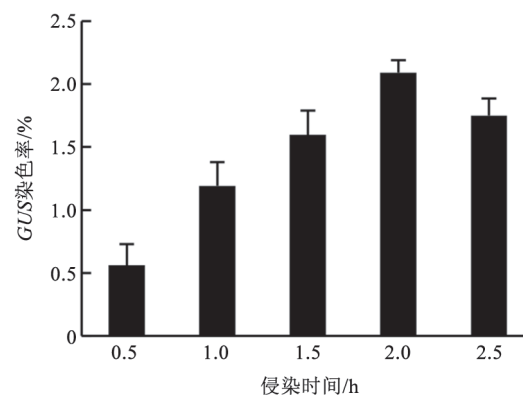


图3 侵染时间对GUS染色率的影响

Fig.3 Effect of infection time on GUS expression efficiency

3 真空处理时间对GUS基因表达率的影响

由图4可知, 真空渗透处理能够对GUS基因表达率产生影响, 试验中设置了5、10和15 min三个不同的处理水平。当真空渗透处理时间为10 min时, GUS基因表达率最高为1.87%。这种现象的原因可能是真空渗透处理能促使农杆菌渗透进外植体生长点细胞处, 影响遗传转化率, 进而影响GUS基因的表达率。然而过长的渗透处理时间也会对生长点处细胞造成伤害, 影响表达率。

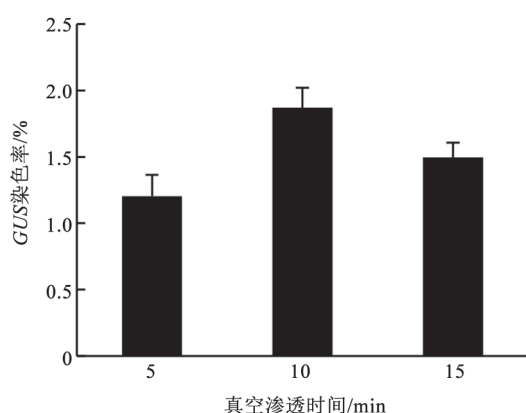


图4 真空渗透时间对GUS染色率的影响

Fig.4 Effect of vacuum infiltration time on GUS expression efficiency

4 除草剂筛选、GUS染色和PCR检测比较

按照上述最优转化参数[侵染液浓度(OD_{600})为0.6, 侵染时间2 h, 真空处理10 min]对供试材料‘郑单958’进行遗传转化试验, 并采用3种不同的检测方法筛选得到转基因阳性植株。当玉米幼芽芽尖经过农杆菌侵染后, 播种在穴盘内, 幼苗长到三叶期时喷洒0.2% PPT除草剂溶液, 连续喷洒2次, 进行筛选, 所得阳性植株移栽至大田。除草剂共喷洒1 047棵幼苗, 存活31棵, 除草剂筛选阳性率为2.96% (图5)。存活的植株移栽至大田后自交授粉, 授粉后15 d幼胚长至3~4 mm时, 取幼胚做GUS染色, 检测GUS基因表达率。31棵植株中, 对每棵植株随机取20个幼胚进行GUS染色, 其中22棵植株的幼胚可被染上蓝色, 染色效果明显(图6), GUS基因表达率为2.1%。22棵植株在大田生长至成熟后, 收获种子在实验室进行发苗处理, 取幼苗的叶片进行PCR分子检测, 22棵植株中有20棵植株的幼苗可以检测到目的条带, PCR检测阳性率为1.91% (图7)。



图5 T₀代植株除草剂抗性检测

Fig.5 Herbicide-resistant test in the T₀ plantlets

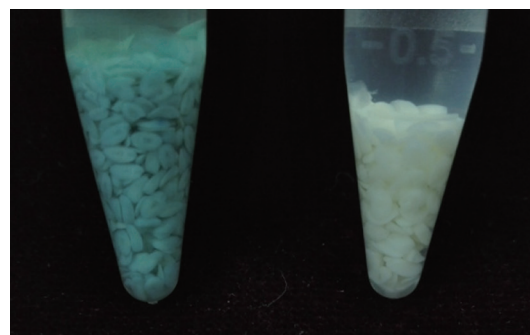


图6 T₁代幼胚的GUS染色反应

Fig.6 GUS gene expression in the T₁ immature embryos
左: 转基因幼胚; 右: 对照。

讨 论

本试验以玉米芽尖生长点作为农杆菌侵染受体, 以GUS基因作为主要的筛选标记基因, bar基因作为初步筛选标记基因, 分别从侵染液浓度、侵染时间和真空处理时间三个方面分析了影响GUS基因转化率的因子, 初步得出结论: 当侵染液浓度(OD_{600})为0.6、侵染时间为2 h、真空处理时间为10 min时, 选用杂交种‘郑单958’作为受体材料将会达到较高的遗传转化率。试验过程中通过3种不同

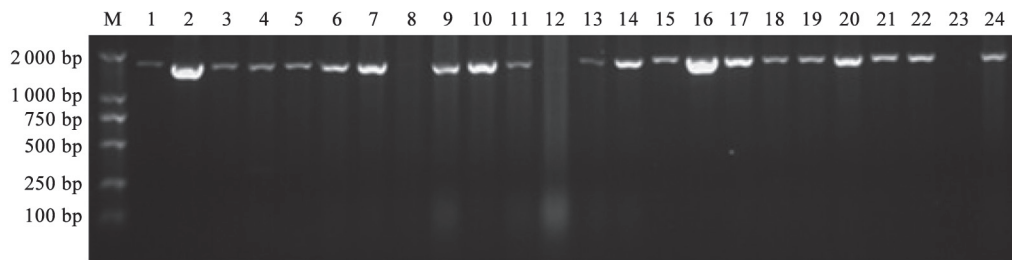


图7 PCR检测结果

Fig.7 PCR detection of putative transformant

M: DL2000 marker; 23: 阴性对照; 24: 阳性对照; 8和12: 非转基因株系; 其他为转基因株系。

的方法检测了转化率情况, T_0 代幼苗进行除草剂筛选, 得到的除草剂筛选阳性率为2.96%; T_1 代幼胚进行GUS染色, 得到的GUS基因表达率为2.1%; T_1 代植株取叶片进行PCR分子检测, 得到的PCR检测阳性率为1.91%。最后分析了出现不同阳性率的原因可能是: 成熟玉米种子的胚内包含有4~6片已经分化好的胚叶, 胚叶内包含着生长点, 当以玉米芽尖生长点作为转化受体用刀片对胚芽进行划伤处理时, 刀片先划破外围的胚叶, 然后再轻微挫伤芽尖生长点, 以便农杆菌侵染到生长点部位, 然而在这个操作过程中会存在刀片并未挫伤生长点或是刀片未把生长点外围的胚叶划透, 导致农杆菌没有真正侵染进入生长点部位的情况发生。在这种情况下, 生长点外围被划破的胚叶中侵染进入了农杆菌, 而生长点部位没有农杆菌侵入, 当幼苗三叶期用除草剂喷洒叶片进行筛选时, 这种幼苗表现出除草剂抗性存活了下来, 然而对其后代进行检测时却检测不到抗性, 因为生长点部位没有真正转入抗性基因, 不能遗传给后代。

自Rhodes等(1988)首次获得玉米转基因完整植株以来, 玉米遗传技术得到了较大发展。在转化的受体系统方面, 除了胚性愈伤组织外, 成熟胚、茎尖、子房及花粉等都有成功的报道。利用玉米茎尖分生组织作为受体材料进行遗传转化是近些年发展起来的技术。Zhang等(1996)用基因枪轰击玉米芽尖分生组织, 将GUS基因转入玉米基因组中。Lowe等(1995)以玉米茎尖分生组织为受体进行遗传转化, 然后诱导产生丛生芽, 从后者中筛选出转化植株。Sidorov等(2006)选用发芽7~10 d的玉米幼苗生长节节点上下0.5 cm部分, 作为愈伤

诱导的外植体并进行转化研究, 遗传转化率在2%~11%之间, 不同材料基因型差异较大。汪婷婷等(2012)选取黑暗条件下培养的黄花苗, 苗长至4~6 cm时, 切去幼叶和胚芽鞘, 用刀轻轻划伤芽尖生长点, 借助农杆菌侵染玉米芽尖将 psy 基因导入到玉米自交系‘天塔五母’和‘7922’中。此类方法选用的是发芽后一段时间的玉米芽尖, 此时生长点处的细胞已不再处于感受态, 对外界因子的作用也已不太敏感, 生长点已经开始分化新的组织和器官原基。此时进行侵染转化试验会产生较多的嵌合体。

与前人研究不同, 本研究的创新点在于选用浸泡后处于露白时期的玉米芽尖生长点作为受体材料, 用刀片剥去种皮和部分子叶, 剥去部分胚芽鞘, 剥开3~4片胚叶, 以便对生长点转化, 借助农杆菌侵染促进转化的实现。其转化原理可能是露白时期的种子处于刚萌发状态, 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(王昌涛等2007)。此时利用农杆菌侵染, 将有利于对生长点的转化, 加上对种子的划伤处理, 为农杆菌进入种子与生长点细胞接触提供了通道, 利于转化的实现。此方法操作相对简单, 对实验条件要求不是很高, 不依赖组织培养技术, 实验周期较短, 并且取材不受季节限制, 但与其他转化方法一样, 转化率的高低也受到侵染液浓度、侵染时间和真空处理时间等因素的影响。基因型是导致玉米遗传转化率低的关键因素(魏开发等2004), 本试验利用此方法只对‘郑单958’进行了转化研究, 而对其他材料基因型尚未开展研究, 因此, 今后需要开展更深入的研究拓展此方法的使用范围。

参考文献

- Chen L, Dou BD, Luo YM, Cao JM, Zhang YX, Sun R, He Y, Hou BW (2006). Establishment of highly efficient regeneration system of maize shoot tip. *J Huaiyin Teach Coll-Nat Sci*, 5 (1): 64–68 (in Chinese with English abstract) [陈莉, 窦秉德, 罗玉明, 曹俊梅, 张永霞, 孙瑞, 何晔, 侯北伟(2006). 玉米茎尖培养再生体系的建立. 淮阴师范学院学报(自然科学版), 5 (1): 64–68]
- Guan H (2011). Research progress of gene transformation in maize using *Agrobacterium tumefaciens*. *Mod Agr*, (7): 15–17 (in Chinese) [关红颖(2011). 农杆菌介导玉米遗传转化的研究进展. 现代化农业, (7): 15–17]
- Lowe K, Bowen B, Hoerster G, Ross M, Bond D, Pierce D, Gordon-Kamm B (1995). Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristems. *Nat Biotechnol*, 13 (7): 677–682
- Qin XM, Zeng DL, Li HM, Qin PS (2011). Genetic transformation of *NPR1* gene to germinating embryo of maize by *Agrobacterium tumefaciens*. *Hubei Agr Sci*, 50 (14): 2985–2988 (in Chinese with English abstract) [秦新民, 曾德龙, 李惠敏, 覃屏生(2011). 根癌农杆菌介导的玉米萌动胚NPR1基因遗传转化. 湖北农业科学, 50 (14): 2985–2988]
- Rhodes CA, Pierce DA, Mettler IJ, Mascarenhas D, Detmer JJ (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240 (4849): 204–207
- Sidorov V, Gilbertson L, Addae P, Duncan D (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep*, 25 (4): 320–328
- Sun C, Guo J, Tao R, Li H, Xing S, Yuan Y (2012). Study on genetic transformation system of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chin Agr Sci Bull*, 28 (36): 71–75 (in Chinese with English abstract) [孙传波, 郭嘉, 陶蕊, 李海华, 邢少辰, 袁英(2012). 农杆菌介导玉米遗传转化体系的研究. 中国农学通报, 28 (36): 71–75]
- Wang CT, Zhao YJ, Li KY, Zhang SH (2007). The establishment of a new genetic transformation system by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in germinating embryo of maize. *Acta Agr Boreal-Sin*, 22 (5): 110–113 (in Chinese with English abstract) [王昌涛, 赵玉锦, 李坤远, 张世煌(2007). 农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化新体系的建立. 华北农学报, 22 (5): 110–113]
- Wang TT, Ji J, Wang G, Guan CF, Zhang L, Jin C (2012). Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of *psy* gene into shoot meristem of maize. *China Biotechnol*, 32 (8): 36–40 (in Chinese with English abstract) [汪婷婷, 季静, 王罡, 关春峰, 张烈, 金超(2012). 农杆菌侵染玉米芽尖导入 psy 基因的研究. 中国生物工程杂志, 32 (8): 36–40]
- Wei K, Gao W, Sun F, Lu L (2004). Advances in critical factors of embryoid formation in maize. 14 (2): 67–68 (in Chinese) [魏开发, 高武军, 孙富丛, 卢龙斗(2004). 影响玉米胚状体建成关键因素研究进展. 生物技术, 14 (2): 67–68]
- Yu YZ, Wang G, Jin NY, Du J, Ji J (2003). Transformation of type II calli of maize inbred lines mediated via *Agrobacterium tumefaciens*. *J Maize Sci*, 11 (3): 28–30, 33 (in Chinese with English abstract) [余云舟, 王罡, 金宁一, 杜娟, 季静(2003). 农杆菌介导优良玉米自交系II型胚性愈伤组织遗传转化体系的建立. 玉米科学, 11 (3): 28–30, 33]
- Yuan Y, Li Q, Hao W, Tan H, Kong X, Zhang G, Liu D (2006). Studies on influencing factors of *Agrobacterium tumefaciens* mediated maize transformation. *Mol Plant Breeding*, 4 (2): 228–232 (in Chinese with English abstract) [袁鹰, 李启云, 郝文媛, 谭化, 孔祥梅, 张光弟, 刘德璞(2006). 农杆菌介导玉米遗传转化影响因素的研究. 分子植物育种, 4 (2): 228–232]
- Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M (1996). Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 92 (6): 752–761

Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *GUS* gene into maize shoot apical growing point

XING Xiao-Long¹, CHANG Ji-Ping¹, FU Zhong-Jun², HU De-Sheng¹, YANG Hui-Li¹, FU Xiao-Kang¹, ZHONG Li-Hua¹, HU Yan-Min^{1,*}

¹College of Agronomy, Henan Agricultural University / Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, Zhengzhou 450002, China; ²Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

Abstract: Using shoot apical growing point of maize hybrid ‘zhengdan958’ seeds as explants, several factors affecting the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation were studied with β -glucuronidase (*GUS*) as transformation gene and *Streptomyces hygroscopicus* phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) as screening gene. The results indicate that good transformation efficiency can be obtained when the concentration of bacterial OD₆₀₀ is 0.6, the co-cultivation time is 2 h, the vacuum infiltration time is 10 min and the receptor is ‘zhengdan958’.

Key words: maize; shoot apical growing point; *GUS* gene; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

Received 2016-02-16 Accepted 2016-03-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31071431).

*Corresponding author (E-mail: huyanmin007@163.com).