

一种利用花粉管结合农杆菌介导方法将 *iaaM* 基因导入玉米自交系的研究

翟亦倩^{1,2}, 罗 昌², 程 曦², 张秀海², 黄丛林², 吴忠义^{1,2*}

(1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; 2. 北京市农林科学院生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要 [目的]利用花粉管结合农杆菌介导方法将 *iaaM* 基因导入玉米自交系。[方法]利用电击转化法将 *iaaM* 基因的表达载体转入农杆菌 LBA4404 菌株中, 通过花粉管通道法将验证正确的菌株直接转化京 24 玉米自交系, 最后通过除草剂筛选及 PCR 检测得到阳性植株。[结果]试验共得到 12 株抗性植株, 其中 10 株为阳性植株。[结论]该研究成功建立了一种无需组织培养体系, 直接利用花粉管通道进行农杆菌介导的玉米转化方法。

关键词 农杆菌转化; 花粉管通道法; 除草剂抗性; 转基因玉米

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03336-03

Research on Transferring *iaaM* Gene to Maize Inbred Lines by Pollen Tube Pathway and *Agrobacterium*-mediated Method

ZHAI Yi-qian et al (College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

Abstract [Objective] The paper was to transfer *iaaM* gene to maize inbred lines by pollen tube pathway and *Agrobacterium*-mediated method. [Method] *iaaM* gene expression vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 using the electric transformation method, and the verified correct strain was directly transformed to the Jing 24 maize inbred lines by pollen-tube pathway method. Finally, the positive plants were obtained by herbicide selection and PCR detection. [Result] The test obtained 12 resistant plants, and 10 of them were positive plants. [Conclusion] The study successfully established a transformation method for maize by pollen-tube pathway and *Agrobacterium*-mediated method without tissue culture system.

Key words *Agrobacterium* transformation; Pollen-tube Pathway; Herbicide resistance; Transgenic Maize

自 1983 年首例转基因植物问世至今, 转基因植物的研究和应用发展突飞猛进。截止 2008 年, 全球共有 13 大类转基因作物实现了商业化种植, 主要包括转基因大豆、玉米、棉花、油菜、南瓜、番木瓜、紫苜蓿、甜菜、番茄、白杨、矮牵牛、甜椒和康乃馨等。利用转基因技术培育作物新品种已成为目前重要的育种手段。然而在转基因作物研发中, 外源基因表达的不稳定和多样化一直制约着转基因作物的研发进度^[1]。

不同的基因转化方法对外源基因的整合及其引起的不同程度的基因重排和结构变异、稳定性及其遗传规律均有明显影响。由于农杆菌介导基因转化具有转化效率高, 能转化较大的 DNA 片段, 可直接用于不同植物组织进行转化, 不需原生质体, 转化的外源基因整合到宿主植物中拷贝数低, 基因重排及基因沉默现象较少等诸多优点^[2], 所以, 一般选择用农杆菌介导单子叶植物基因转化。对农杆菌介导法转化的小麦、水稻、玉米等转基因植株的研究表明, 外源基因通常以单拷贝或寡拷贝的形式整合, 且外源基因能稳定遗传。此外, 向农杆菌菌悬液中添加一定浓度的无机盐、蔗糖、乙酰丁香酮等可提高农杆菌的转化效率。

玉米根系的生长发育状况及其在土壤中的分布状况与地上部的生长发育及产量形成关系密切。作为土壤-植物-大气间的水分循环过程中最关键的部分之一, 根系与玉米抗旱性的形成必然具有密切的关系^[3]。为此, 笔者克隆了根系发育调控相关激素的合成及代谢基因, IAA 合成关键酶基

因 *iaaM*, 并将 *iaaM* 与根特异启动子连接进行转基因, 检测其对植物抗旱性的影响。

IAA 在植物生根中起中心作用, 很多诱发生根的因子都是通过 IAA 起作用的。适宜浓度的 IAA 可促进不定根的生长, 且侧根发育也需要 IAA。体外施加 IAA 可促进侧根的发育, 而内源 IAA 水平升高的突变体或转基因植株则表现侧根数目的增加。烟草 *iaaM* 基因的转基因植株可表现出较高的含水量、保水能力, 且耐热性强于野生型植株^[4]。还有研究发现组织特异性表达的 *iaaM* 基因植株表现出更发达的根系系统^[5]。笔者在根特异性启动子的驱动下将该上述基因连接到植物表达载体上, 以期最终获得根系发达、透水性好、地上部生长正常的转基因植株, 从而减少干旱对玉米生长的胁迫。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。试验所用玉米自交系为京 24 玉米自交系。

1.1.2 农杆菌菌株及质粒。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404, 由北京市农林科学院生物中心花卉和重要经济植物实验室提供。pGreen0229 通用载体, 由北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心花卉实验室提供。*iaaM* 基因的克隆及其连接至以根特异性启动子 EXP18-D 为启动子的 pGreen0229 通用载体上的工作, 由中国农业大学贾文锁老师实验室完成(载体含有 35S *bar* 抗性基因)。

1.1.3 供试培养基。植物培养基: 1/2MS 基本培养基 + 100 $\mu\text{mol/L}$ AS + 0.02% Silwet + 6 nmol/L 6-BA + 0.01 mol/L Ca^{2+} + 15 g/L 蔗糖; 农杆菌培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L。

1.2 方法

1.2.1 *iaaM* 基因表达载体电击转化农杆菌 LBA4404。将 2

基金项目 国家转基因专项 (2009ZX08003-009B); 北京市科委项目 (KJ CX201102003, Z111100066111005, Z121100001512012)。

作者简介 翟亦倩 (1987 -), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向: 玉米转基因, E-mail: yiqianzhai@163.com。* 通讯作者, 副研究员, 硕士生导师, 博士, 从事玉米转基因研究, E-mail: zwu22@126.com。

收稿日期 2013-03-08

μl 质粒加入到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中,用手轻弹混匀,冰上放置 30 min 后转移至在冰上预冷的电击杯中。将电转化仪的电压设置为 2.5 kV。将电击杯擦干,放入电转化仪进行电击。电击完成后,取出电击杯,立即向其中加入 1 ml LB 培养基,用枪头上下冲洗混匀。混匀后将其转移至 1.5 ml 离心管中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、260 r/min,培养 1 h,离心,弃上清,用枪头混匀后涂板,28 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。

农杆菌的培养基:LB 基本培养基加抗生素 Kan 50 mg/L、Rif 50 mg/L、四环素 5 mg/L。对电击转化后的农杆菌菌落进行小摇、大摇培养后,验证转化是否成功。

1.2.2 电击转化农杆菌的菌液 PCR 验证及酶切验证。取待验证的农杆菌菌液 0.5 ml,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉培养基,加入 80 μl ddH₂O 重悬,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 1 min,取 0.5 μl 上清作为模板。

PCR 程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增体系为 25 μl ,包含:上清液 0.5 μl , *Ex Taq* Buffer 2.5 μl , dNTPs 2 μl , 上游引物 0.5 μl , 下游引物 0.5 μl , *Ex Taq* 聚合酶 0.25 μl , dd H₂O 19 μl 。

HindIII 酶切验证:提取培养好的农杆菌的质粒进行酶切验证。酶切体系为:质粒 DNA (100 ng/ μl) 8 μl , 10 $\times$ M Buffer 2 μl , *HindIII* 1 μl , ddH₂O 9 μl 。

1.2.3 农杆菌的培养。将验证正确的菌种在加有抗生素 Kan 50 mg/L、Rif 50 mg/L、四环素 5 mg/L 的 LB 固体培养基上划线培养。转化试验前挑取单克隆接种于加有 Kan 50 mg/L、Rif 50 mg/L、四环素 5 mg/L 的液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床上培养过夜,使农杆菌生长至对数期,转接一次^[6]。5 000 r/min,离心 10 min 收集菌体,用 1/2MS 液体培养基洗 2 次,再用相应的液体培养基将农杆菌浓度调至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右,向其中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ AS + 0.02% Silwet + 6 nmol/L 6-BA + 0.01 mol/L Ca²⁺ + 15 g/L 蔗糖用于转化。

1.2.4 花粉管通道法转化。选择玉米自交系京 24 进行转化。当自交系雌穗出芽时,对其进行套袋处理,雄穗散粉时,进行人工自交授粉。授粉 20 h 后,用剪刀剪除距离穗顶 2 cm 以上的花丝和苞叶,修剪剩余的花丝使其呈现一小窝,用移液枪迅速于切口处滴加 200 μl 准备好的农杆菌菌悬液,套上纸袋,做好标记。等其成熟后,单独收获晒干并脱粒,待用。

1.2.5 转基因玉米的筛选。将收获的玉米种子晒干后,于夏季种于实验田内,至玉米苗长至三叶期时,喷洒 200 mg/L 的草铵膦 (PPT) 除草剂,对转基因玉米进行田间初筛。

1.2.6 T₀ 代玉米的 PCR 检测。选择对草铵膦抗性较强的植株,提取其幼嫩玉米叶片的总 DNA:叶片用组织研磨仪研磨后,利用 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒 (Promega) 进行提取。

利用 Primer5.0 软件设计特异性引物,35S *bar* 基因的引物为:35S *bar*-F (5'-ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3') 和 35S *bar*-R (5'-TCAACTGTCCAATCGTAAGCGTTCC-3')。

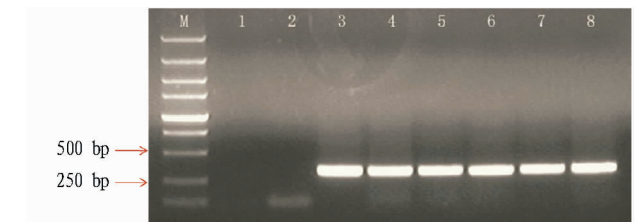
PCR 程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增体系为 25 μl ,包含:质粒 DNA (0.5 ng/ μl) 2 μl , *Ex Taq* Buffer 2.5 μl , dNTPs 2 μl , 上游引物 1 μl , 下游引物 1 μl , *Ex Taq* 聚合酶 0.25 μl , ddH₂O 16.25 μl 。

根特异性启动子 *EXP18-D* 基因的引物为:EXP18D-F (5'-GCTGGAAAGA ACGTGTCTCTA ACACCTCCAAA-3') 和 EXP18D-R (5'-TCTACGTA CCGTTTCCTC CATCAGAAAT-3')。PCR 程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增体系为 25 μl ,包含:质粒 DNA (0.5 ng/ μl) 2 μl , *Ex Taq* Buffer 2.5 μl , dNTPs 2 μl , 上游引物 1 μl , 下游引物 1 μl , *Ex Taq* 聚合酶 0.25 μl , ddH₂O 16.25 μl 。

向扩增后的 PCR 溶液中加入 5 μl 6 $\times$ Loading buffer,混匀后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

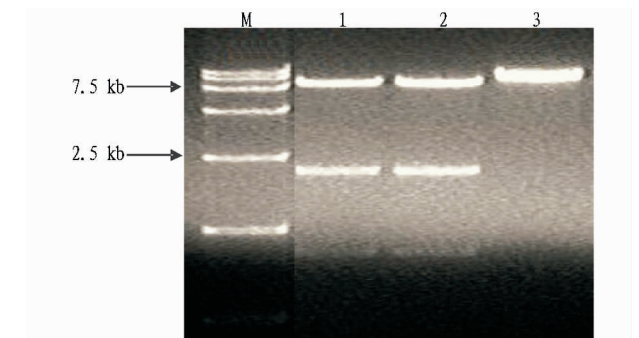
2.1 农杆菌菌液 PCR 验证 菌液 PCR 结果 (图 1) 表明,通过电击转化的方法, *iaaM* 基因表达载体已转入农杆菌菌株。



注: M. DL5000 DNA Marker; 1. 水对照; 2. 阴性对照 (未转化农杆菌菌液); 3. 质粒阳性对照; 4 ~ 8. 农杆菌菌液。

图 1 农杆菌菌液 PCR 验证

2.2 电击转化农杆菌的酶切验证 *iaaM* 基因表达载体的 *HindIII* 酶切结果理论上应有 9 600、2 085、700 bp 3 条带。如图 2 所示,泳道 1、2 酶切验证正确,表明 *iaaM* 基因表达载体已电击转入农杆菌菌株 LBA4404 当中。



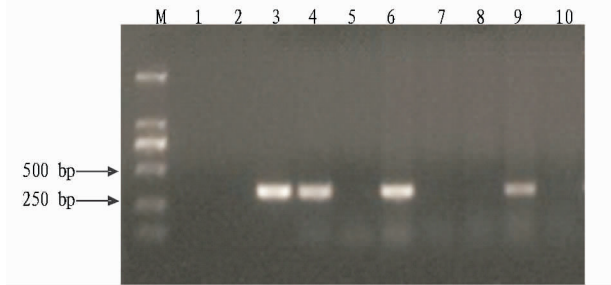
注: M. DL 15K DNA Marker; 1 ~ 3. *iaaM* 转化农杆菌质粒酶切产物。

图 2 农杆菌质粒的 *HindIII* 酶切验证

2.3 转基因玉米的筛选 经 200 mg/L 草铵膦筛选 1 周后,没有抗性的玉米幼苗叶片枯黄,2 周后枯死,与未转基因的自交系对照玉米幼苗呈相似症状,而具有草铵膦抗性的玉米幼苗生长正常,叶片颜色只有稍许黄化。试验通过农杆菌转化法共收获得到 *iaaM* 转基因抗性植株 12 棵。

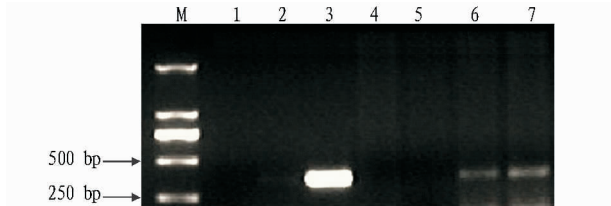
2.4 T₀ 代玉米的 PCR 检测结果 对转化 *iaaM* 基因表达载

体的玉米植株进行 PCR 检测,35S *bar* 基因的 PCR 扩增产物应为 340 bp, *EXP18-D* 基因的 PCR 扩增产物应为 380 bp。检测结果表明(图 3), *iaaM* 基因表达载体的转化,获得了 35S *bar* 基因阳性植株共 10 棵。通过对 35S *bar* 基因阳性植株进行 *EXP18-D* 基因的 PCR 检测,获得目的基因阳性植株(图 4),即 *iaaM* 基因表达载体的转化,已分别获得了兼具 35S *bar* 基因和目的基因的植株。



注:M. DL2000 DNA Marker;1. 水对照;2. 未转基因阴性对照;3. 质粒阳性对照;4~10. 除草剂抗性转 *iaaM* 基因植株。

图 3 35S *bar* 基因的 PCR 检测



注:M. DL2000 DNA Marker;1. 水对照;2. 未转基因阴性对照;3. 质粒阳性对照;4~7. *bar* 基因阳性转 *iaaM* 基因植株。

图 4 *EXP18-D* 基因的 PCR 检测

3 结论与讨论

禾本科植物玉米是粮食和饲料的主要来源。随着社会对粮食产量和品质提出更高的要求,利用转基因技术改善禾本科植物性状的基因工程研究的优越性也越来越突出。

玉米根系的生长发育状况及其在土壤中的分布状况与地上部的生长发育及产量形成关系密切。作为在土壤-植物-大气间的水分循环过程中最关键的部分之一,根系与玉米抗旱性的形成必然具有密切的关系^[3]。因此该试验选择 IAA 合成关键酶基因 *iaaM*,并将其连接至入玉米表达载体中。利用电击转化法,将其转入农杆菌中。培养验证正确的农杆菌菌株进行后期的玉米转化试验。经花粉管通道法转

化玉米植株后,得到含有 *bar* 基因及目的基因的转基因玉米株系。

农杆菌介导法因转化的外源基因整合到宿主植物中拷贝数低,外源基因能够稳定遗传等优点,而得到广泛应用。由于单子叶植物并不是农杆菌的天然寄主,该方法起初只用于双子叶植物中,但近十几年来在单子叶植物中也得到了广泛应用^[7]。

该试验通过优化农杆菌的培养条件,及添加部分农杆菌重悬液组分,使农杆菌转化法更适宜于对单子叶植物玉米的转化。花粉管通道法具有操作简单、成本低、可进行批量转化等优点^[8],因此笔者采用花粉管通道法进行转化。将载体上含有的 *bar* 基因作为筛选基因,使得被转化的玉米带有草胺磷抗性,从而方便大规模的筛选,降低了筛选成本,提高了筛选效率。转基因食品的安全问题日益受到大众的关注,而其中关注的重点即转化筛选标记的选择,目前通过抗生素进行筛选的转基因作物不能投入到大规模的中间试验以及生产中去,因此该研究选择 *bar* 基因作为筛选标记^[9]。

参考文献

- [1] 王军辉, 张建国, 胡建军, 等. 转基因欧洲黑杨中 Bt 基因表达特性的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004(1): 49-52.
- [2] 罗红梅, 李琦, 姜丹, 等. 农杆菌介导的单子叶植物基因转化研究进展[J]. 牡丹江师范学院学报, 2002(3): 6-8.
- [3] 孙彩霞, 沈秀瑛. 玉米根系生态型及生理活性与抗旱性关系的研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(3): 20-24.
- [4] PUSTOVOITOVA T N, BAVRINA T V, ZHDANOVA N E. Drought tolerance of transgenic tobacco plants carrying the *iaaM* and *iaaH* genes of auxin biosynthesis[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2000, 47(3): 380-385.
- [5] ZHANG Y, ZHAO L H, WANG Y, et al. Enhancement of heavy metal accumulation by tissue specific co-expression of *iaaM* and ACC deaminase genes in plants[J]. Chemosphere, 2008, 72(4): 564-571.
- [6] 谢伶俐, 李加纳, 殷家明, 等. 根瘤农杆菌介导转化甘蓝型油菜子叶 GUS 基因瞬时表达[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 9-13.
- [7] 李浩戈, 金迪, 马慧, 等. 农杆菌介导主要农作物遗传转化的研究进展[J]. 辽宁农业科学, 2012(4): 38-42.
- [8] DI H M, WANG X F, CAO Q F, et al. Effects of Ultrasonication on Genetic Transformation via the Pollen-Tube Pathway in Chinese Cabbage[J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(12): 1773-1776.
- [9] 王霄汉, 罗昌, 程曦, 等. PGM-35Sbar 玉米通用表达载体的构建及玉米转化研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(25): 12367-12370.
- [10] QIN X M, LI H M, ZENG Z H, et al. Studies on Genetic Transformation of NPR1 Gene into Maize by Microprojectile Bombardment[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(1): 40-43, 78.
- [11] 钟鸣, 黄国涛, 白丽萍, 等. 基于农杆菌介导法的植物转基因载体的改造[J]. 华北农学报, 2011(1): 41-46.

(上接第 3305 页)

- [7] CHEN S R, JIANG B, ZHENG J X, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from skky fowl (*Gallus gallus domesticus*: Brisson)[J]. Food Chemistry, 2008, 111(3): 745-749.

- [8] 曹志艳, 董金皋, 杨胜勇. 玉米大斑病菌黑色素的一些理化性质和光谱吸收特征[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 410-417.
- [9] 付湘晋. 我国天然黑色素资源研究概况[J]. 粮油与油脂, 2005(12): 42-46.