

文章编号: 1005-0906(2005)04-0013-03

花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系的研究

关淑艳¹, 张健华³, 柴晓杰¹, 马义勇², 曲同宝¹, 孙波³, 王丕武¹

(1. 吉林农业大学生物技术中心; 2. 吉林农业大学试验站, 长春 130118; 3. 双辽县农业技术推广中心, 吉林 双辽 136400)

摘要: 实验主要利用花粉管通道技术将淀粉分支酶基因的反义表达载体转入玉米自交系中, 同时探讨了不同导入时间、不同 DNA 浓度、不同导入量等对其转化率的影响, 并从中得出花粉管通道法的最佳转化条件。同时将转化的玉米植株进行 PCR 检测, 初步证明外源目的基因已整合到玉米基因组中, 并得到了转化植株的种子。

关键词: 玉米自交系; 淀粉分支酶基因; 反义载体; 花粉管通道

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Research on Transforming Expression Vector of Starch Branch Enzyme Gene to Maize Inbred Lines by Using Pollen Tube Pathway

GUAN Shu-yan¹, ZHANG Jianhua³, CHAI Xiao-jie¹, MA Yi-yong², et al.

(1. Faculty of Biotechnology of Jilin Agricultural University;

2. Experiment Centre of Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

3. Shuangliao Extending Centre of Agricultural Technology, Shuangliao 136400, China)

Abstract: In this experiment, we transformed expression vector of Starch Branch Enzyme Gene to maize inbred lines. At the same time, we did some research on effect of different transforming time, concentration of DNA, transforming content and other characteristics on transforming rate, and we got the optimum transforming condition of Pollen-Tube Pathway. At the same time, we examined the transformed plants, which indicated that the genes had been transferred into the genome of maize, and we got transformed seeds.

Key words: Maize inbred lines; Starch branching enzyme gene; Anti-sense vector; Pollen tube pathway

玉米淀粉广泛应用于食品、医药、造纸、化学、纺织、建筑、石油化工、燃料和塑料等领域。特别是玉米高直链淀粉的用途涉及到各个领域, 如: 光纤、高度印刷线路板、电子芯片等行业。另一个潜在利用价值是玉米高直链淀粉是生产光解塑料的最佳原料, 是解决目前严重的“白色污染”的有效途径。因此, 培育高直链淀粉玉米品种具有重要意义。

花粉管通道转化技术作为一种转基因技术, 自 70 年代末开始应用于农作物的种质创新和新品种选育。花粉管通道转化技术是不依赖于组织培养的受体体系的一种遗传转化方法, 这种技术不需要昂

贵的仪器设备和组织培养技术, 不受克隆基因数量的限制, 转化率高于其他转基因技术, 还可以转移多基因控制的数量性状, 这一技术同其他转基因技术相比, 具有简单、方便、育种时间短、基因源广, 并可直接运用于常规育种等优点。本研究主要是利用花粉管通道技术将淀粉分支酶基因的反义表达载体转入到玉米自交系中, 抑制淀粉分支酶基因的表达, 提高玉米直链淀粉的含量, 探讨反义核酸技术在玉米直链淀粉改良中的作用机制, 是开辟玉米高直链淀粉育种的新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料: 玉米自交系为铁 7922、吉 853、丹 340、Mo17、5003 和春 09。

质粒: 质粒 PCAM1301, 含有淀粉分支酶基因的

收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20040203-2-2)

作者简介: 关淑艳(1971-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物病理学研究。E-mail: guanshuyan1971@yahoo.com.cn

王丕武为本文通讯作者。Tel: 13134316758

反义表达载体并且带 Kam 和潮霉素选择性标记基因。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米花粉管通道转化技术

选择玉米骨干自交系和具有潜在应用价值的自交系作为受体,在开花期从受体自交系群体中选择发育正常的健壮典型植株进行套袋自交。在自交后 6~8 h 之后进行导入,先将雌穗上的纸袋摘下,用剪刀将雌穗靠近果穗花丝顶部全部剪去,留下平齐的切面,然后用针式微量进样器在切口处滴注 100~800 μL 制备好的质粒 DNA 溶液,立即重新套上纸袋,记载导入时间和质粒 DNA 量以及质粒的浓度等。待玉米果穗成熟时,把导入果穗分别收获晒干脱粒,用于 PCR 检测。

1.2.2 质粒 DNA 的提取

参照王关林主编的《植物基因工程》(第二版)碱裂解法,提取后在 0.8% 的琼脂糖胶上电泳,分析其纯度和浓度。

1.3 转化植株的筛选和 PCR 检测

将花粉管导入后收获的种子取相应粒数,用 400 mg/L 的卡那霉素溶液浸泡 24 h 后分批分次播种于温室花盆中。出苗后每隔一周用 400 mg/L 的卡那霉素水溶液进行喷浇,可看到一部分苗出现白化现象。T₀ 代植株长出 4~5 个叶片时进行检测,取植株叶片按 SDS 法提取总 DNA,PCR 检测。

引物及扩增体系如下:

(5' 端引物)引物 P1 5'-GGATCCAAATGCAGATCGTATG-3'

(3' 端引物)引物 P2 5'-GAATTCTGCTAAATC CACCAAATAGTCCAGC-3'

PCR 反应体系总体积 50 μL,扩增反应参数:94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环,72℃ 延伸 5 min。扩增产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外凝胶成像仪进行分析。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素浓度对 T₀ 代转化植株白化率的影响

分别用不同浓度的卡那霉素溶液喷浇 T₀ 代转化植株,采用的浓度分别为 0、50、100、200、300、400、500、600、700 和 800 mg/L。一周之后调查植株的致死及白化率情况,统计结果为 200、400、800 mg/L 浓度的卡那霉素溶液的白化率分别在 30%、60% 和 95% 左右。结果发现,不同基因型对卡那霉素的白化反应无显著差异。由于该转化方法利用的是花粉萌发后形成的花粉管通道,滴加在花柱横断面上的质粒 DNA 进入胚囊需要经历较长一段旅程,期间部分外源 DNA 不可能完全转化进去。在用卡那霉素进行筛选时,为了减少 PCR 检测的繁琐,同时为了防止因导入过程中 DNA 片段断裂所引起的筛选过度,选择合适的临界浓度是提高转化率的一个重要因素。所以本实验认为用 400 mg/L 的浓度进行 T₀ 代转化植株的抗性筛选较为合适。以后采用 400 mg/L 的卡那霉素浓度进行喷浇。表 1 是不同品种的 T₀ 代转化植株喷浇 400 mg/L 卡那霉素浓度溶液后的白化率情况。

表 1 卡那霉素溶液喷浇后 T₀ 代转化植株的白化率情况

编号	品种	总粒数	检测粒数	出苗数	白化苗数	白化率(%)	编号	品种	总粒数	检测粒数	出苗数	白化苗数	白化率(%)
1	5003	520	100	75	20	26.90	14	吉 853	163	50	24	10	41.70
2	5003	670	100	90	42	43.90	15	吉 853	125	50	22	17	77.30
3	5003	932	100	78	21	23.90	16	吉 853	395	50	19	15	78.90
4	5003	352	100	80	62	77.50	17	吉 853	751	50	19	15	78.90
5	春 09	780	50	45	30	66.70	18	吉 853	965	50	0	0	0.00
6	春 09	650	50	40	15	37.50	19	丹 340	25	20	15	8	53.30
7	春 09	601	50	30	18	60.00	20	丹 340	59	50	28	10	35.70
8	春 09	580	50	40	20	50.00	21	丹 340	14	10	8	2	25.00
9	Mo17	750	50	21	16	76.20	22	丹 340	47	40	32	15	46.90
10	Mo17	108	50	21	8	38.10	23	铁 7922	9	9	6	3	50.00
11	Mo17	480	50	19	8	42.10	24	铁 7922	78	50	31	10	32.30
12	Mo17	644	50	32	22	68.80	25	铁 7922	180	50	28	8	28.60
13	Mo17	181	50	28	13	46.40	26	铁 7922	90	50	32	5	15.60

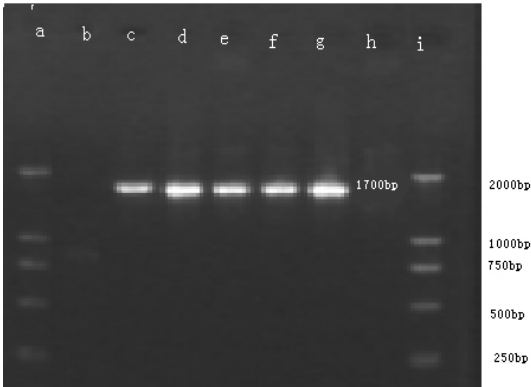
2.2 卡那霉素的抗性筛选和 PCR 检测结果

本实验用 400 mg/L 的卡那霉素溶液喷浇出苗的 863 株转基因植株,进行 PCR 检测,结果获得了 8 株抗性植株,总的转化率为 0.93%。但如果从单一某一品种的某一组合来说,最高的转化率为 5.2% (PCR 的反应体系及反应条件同农杆菌介导法,见图 1)。这就从分子水平上验证此项技术在玉米上应用

的可行性,该方法避免了利用农杆菌和基因枪法导入目的基因难以得到再生植株的困难,节省人力、物力,并获得了大量种子。

从表 2 的结果可以看出,导入时间为早上 6:00~8:30 时、下午 4:00~7:00 时效果最好。而在中午 9:00~16:00 时,由于阳光比较强烈,第一代玉米花丝上含有质粒的溶液易蒸发,在一定程度上影响了

基因的导入效果，导入间隔时间要在自交授粉后 8 ~ 20 h 范围内较好,这与王罡等人研究的结果一致。因为在此阶段,双受精卵细胞处于最佳感受态,易于外源 DNA 的进入和整合。另外导入时以 SSC 溶解质粒较好，一般采用导入浓度为 500 μg/mL、导入量为 200 μL 的处理即可达到很好的结果。在实验的过程中最重要的是掌握好玉米的授粉时间，以保证导入间隔时间的准确性。但由于自然条件复杂多变,如每天的不同时段温度、湿度等各有其基本变化规律,不同的日期同一时段又可能有显著的差异。因此,要充分考虑各影响因子，确定最佳导入时间间隔和导入时间还需要因地因时而异。



a 为 iDL2000DNA 分子量标记;e 为阳性质粒;
c、d、f、g 为转基因植株;b、h 为非转基因植株对照

图 1 转基因植株的 PCR 检测

表 2 T₀代植株抗性筛选 PCR 检测结果

编号	导入时间 (时)	导入间隔时间 (h)	质粒浓度 (μg/mL)	质粒的溶解方式	导入量 (μL)	导入果穗数	检测粒数	PCR 阳性株数
1	9 : 30	18	回收片段	SSC	200	4	100	0
2	5 : 30	9	500	SSC	200	5	100	2
3	17 : 30	8	800	水	200	6	100	0
4	9 : 30	18	500	SSC	100	1	100	1
5	17 : 00	8	500	SSC	100	5	50	1
6	9 : 25	17	200	水	100	4	50	0
7	9 : 30	18	800	SSC	50	4	50	0
8	9 : 20	18	200	水	100	2	50	0
9	17 : 00	10	500	SSC	100	1	50	1
10	9 : 16	18	回收片段	SSC	100	1	50	0
11	7 : 00	16	800	SSC	50	4	50	0
12	6 : 00	12	800	水	100	5	50	0
13	5 : 00	14	800	SSC	200	2	50	1
14	11 : 00	18	200	水	100	1	50	0
15	10 : 00	17	回收片段	SSC	50	1	50	0
16	8 : 30	16	800	SSC	200	2	50	0
17	16 : 00	8	800	SSC	200	4	50	1
18	7 : 00	16	800	SSC	200	5	50	0
19	10 : 30	22	200	水	100	1	20	0
20	9 : 40	14	800	水	200	2	50	0
21	11 : 00	20	500	水	50	1	10	0
22	10 : 00	19	800	水	100	1	40	0
23	20 : 00	11	回收片段	SSC	100	1	9	0
24	9 : 00	17	200	SSC	200	1	50	0
25	7 : 00	12	800	SSC	50	1	50	0
26	12 : 00	24	500	水	200	1	50	1

3 讨 论

目前,基因枪法、农杆菌介导法和花粉管通道法是外源基因导入玉米的主要途径。基因枪法的最大优点是不受宿主材料类型的影响，并可同时将多个基因导入植物，但缺点是仪器设备昂贵和易引起外源基因的多拷贝。农杆菌介导法则成本低廉,并可避开许多栽培品种的原生质体难以再生的问题，且通常为低拷贝或单拷贝整合,大多符合孟德尔遗传,但单子叶植物对农杆菌不敏感,转化效率不是很高。花粉管通道法是利用授粉后花粉发芽时花粉管进入胚囊所形成的通道,将外源 DNA 导入受体(受精卵)的一种方法。具有无基因型限制和易于实现大规模基

因转化的特点，可以在任何开花植物和不同物种之间实现基因的转移，而且不需要昂贵的仪器设备和组织培养技术,并省去了组织培养过程,从而避免了植物组织培养过程中可能会产生的对植物基因型的依赖和各种无法预测的体细胞变异对后代的不利影响,一般也不会形成嵌合体,只是此法的检测比较繁琐。

外源基因能否在受体植物中稳定遗传和表达是转基因育种成败的关键。已有的结果表明,外源基因在受体植物内的整合、遗传和稳定性是十分复杂的。本实验用花粉管通道法对淀粉分支酶基因反义表达载体的遗传转化的研究,通过转化植株后代的 PCR 分析,初步证明了淀粉分支酶基因反义(下转第 23 页)

(上接第 15 页) 表达载体已整合到受体植株的基因组中,并在后代中得以表现。关于该基因后代的淀粉含量以及淀粉酶活力,将做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 陈艳萍,等.高直链淀粉玉米研究进展[J].南京农专学报,2002,18(3):32-40.
- [2] 王立新,孟荣华,郭仁俊,等.用花粉管通道法进行小麦抗白粉病转基因的研究初报[J].农业生物技术学报,2001,9(3):265-268.
- [3] 陈春洪,王志坚,孙 玲,等.用花粉管通道将外源 DNA 导入水稻的研究[J].广西农业科学,1998,4:2-3.
- [4] 柴晓杰,王丕武,张 君,等.玉米淀粉分支酶基因的克隆和反义

载体的构建[J].玉米科学,2004,12(2):105-107.

- [5] 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(4):40-44.
- [6] 王 罡,杜 鹃,张艳华.用花粉管通道法将 Bt 杀虫基因导入玉米自交系的研究[J].玉米科学,2002,10(1):36-37.
- [7] 王才林,赵 凌,宗寿余,等.用花粉管通道法将 bar 基因导入水稻获得可遗传的转基因植株[J].江苏农业学报,2002,18(3):129-133.
- [8] 倪万潮,郭三堆,贾士荣.花粉管通道法介导的棉花遗传转化[J].中国农业科技导报,2000,2(2):27-32.
- [9] 华志华,黄大年.转基因植物中外源基因的遗传学行为[J].植物学报,1999,41(1).