

文章编号: 1005-0906(2014)06-0032-04

玉米花粉管通道法转化脱水素 *BDN1* 基因

孟宪玉¹, 单长建¹, 王乾坤¹, 田雨¹, 王振华¹, 邸宏^{1,2}

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江八一农垦大学/寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 通过花粉管通道法将脱水素基因 *BDN1* 转入玉米自交系合 344 中, 并对转化后代进行 PCR 和 RT-PCR 分子检测以及耐盐性功能鉴定, 筛选耐盐性较高的转基因玉米新种质。结果表明, 实验共获得 88 株 T0 代除草剂抗性植株, 其中 31 株 PCR 检测呈阳性, 14 株 RT-PCR 检测呈阳性, 对 T4 代转基因株系苗期进行 300 mmol/L NaCl 溶液的盐胁迫处理, 2 个转基因株系耐盐性比对照提高两个级别。

关键词: 玉米; 花粉管通道法; 脱水素基因; *BDN1*; 耐盐性

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Introduction of Dehydrin Gene(*BDN1*) into Maize by Pollen Tube Pathway

MENG Xian-yu¹, SHAN Chang-jian¹, WANG Qian-kun¹, TIAN Yu¹, WANG Zhen-hua¹, DI Hong^{1,2}

(1. Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

2. Key Laboratory of Crop Germplasm Improvement and Cultivation in Cold Regions, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Dehydrin gene *BDN1* was introduced into maize inbred line He344 by pollen tube pathway. Eighty-eight T0 maize transformed plants resisted to herbicide, among which 31 plants showed positive PCR reaction and 14 plants showed positive RT-PCR reaction. Eight transgenic maize lines with *BDN1* gene were identified salt-tolerance by observing the seedling appearance under 300 mmol/L NaCl stress. Two transgenic maize lines have improved their salt tolerance ability by two-level compared to acceptors.

Key words: Maize; Pollen tube pathway; Dehydrin gene; *BDN1*; Salt tolerance

盐渍、干旱、低温和高温等水份胁迫是高等植物面临的主要环境问题, 表现为不同程度对植物体内水分状况的影响。研究表明, 很多基因的表达受水分胁迫的诱导并在植物抵抗水分胁迫中起作用, 脱水素(Dehydrin)就是其中较重要的一种。脱水素是一类 LEA(Late embryogenesis abundant)蛋白, 它能够在植物胚胎发育后期以及处于干旱、低温、盐碱等逆境的植株中大量表达, 主要功能是保护植物细胞中

的大分子在脱水过程中不受伤害^[1]。脱水素在植物界广泛存在, 在植物体内具有多种保护作用, 主要表现为对生物膜和蛋白质结构的稳定作用, 阻止冰晶的进一步扩大, 从而减小逆境和脱水过程对植物细胞的伤害。目前, 已有多个脱水素基因或相关基因被克隆, 如大麦、小麦、玉米及拟南芥等^[2~4]。本实验将来自于极耐旱植物厚叶旋蒴苣苔(*Boea crassifolia*)中克隆的脱水素基因 *BDN1*^[5] 转入玉米中, 研究该基因在提高玉米耐盐碱功能中的作用, 为耐盐碱作物基因工程提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用玉米优良自交系合 344 为遗传转化受体材料, 由东北农业大学农学院玉米研究室提供。实验用载体质粒 p2301-BDN1, 由 CaMV35S 启动子驱动

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 黑龙江省留学归国人员科学基金(LC201411)、黑龙江省寒地作物种质改良与栽培重点实验室开放课题资助项目(CGIC201202)

作者简介: 孟宪玉(1990-), 硕士, 主要从事玉米遗传转化及后代验证方面的研究。

邸宏为本文通讯作者。E-mail: dihongdh@163.com

脱水素基因 *BDN1*, 选择标记基因为 *NPTII*, 由北京大学生命科学院林忠平教授提供(图1)。

1.2 实验方法

在晴天的上午, 将浓度为 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质粒 DNA 溶液, 滴在人工授粉 18 h 后的玉米花丝上, 以操作的穗为单位收获 T0 代种子^[6]。收获的转化子粒在培养钵上种植, 幼苗 3 叶期时喷施 0.1% 的 Basta 溶液进行除草剂抗性筛选, CTAB 法提取抗性植株叶片总 DNA 进行 PCR 检测, 引物序列为, F: 5'-GTGGGCTGTTTGATTTTAT-3', R: 5'-ACACTTCCTCGGTC-TTCTT-3'。PCR 反应条件为, 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 1 min, 54℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。反应完毕后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

对 T0 代 PCR 阳性植株严格自交, 收获种子加代繁殖, 下一世代按照穗行种植, 在苗期进行除草剂、PCR 检测, 并提取 RNA 反转录成 cDNA 进行 RT-PCR 检测。

对 T4 代分子特征稳定的转基因植株和受体对照自交系进行苗期盐胁迫处理。用 10 g/L 次氯酸钠消毒种子 20 min 后, 置于培养箱中采用常规方法发芽; 将芽长基本一致的种子培养于蛭石基质中, 设 3 次重复, 每个重复 30 株, 每日浇灌 1/2 Hoagland 营养液; 温室中培养至 3~4 叶期时, 用含 300 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液连续处理 7 d, 浇灌量为蛭石持水量的二倍^[7]。同时设置普通营养液浇灌处理作为对照组, 观察植株的苗情, 参考付艳^[8]的分级方法评定各株系的耐盐性。

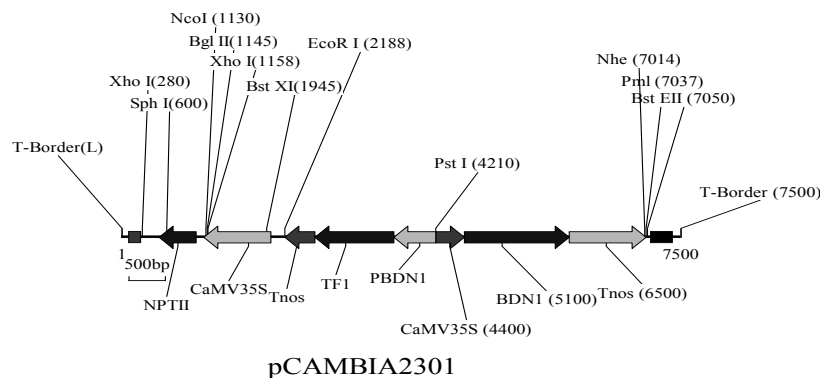


图1 质粒pCambia2301-BDN1图谱

Fig.1 Map of construction of pCambia2301-BDN1 plasmid

2 结果与分析

2.1 花粉管通道法遗传转化的结果

本研究针对玉米自交系合 344 共转化 32 个雌穗, 部分雌穗由于 DNA 的导入发育不良而未能收获子粒, 结实的雌穗大约占全部操作果穗的 50% 左右。T0 代共获得 1 286 个子粒, 出苗 842 株, 经 0.1% 的 Basta 溶液喷施检测, 共获得 88 株除草剂抗性株数, 阳性率为 10.45%。

2.2 PCR 检测结果

针对目的基因序列设计特异引物, 提取叶片总 DNA 作为模板, 以含有目的基因的质粒 DNA 为阳性对照, 非转基因受体合 344 自交系 DNA 为阴性对照, 同时设置水空白对照, 对 88 株 T0 代除草剂抗性植株进行 PCR 检测。部分扩增产物的电泳检测结果表明(图2), 共有 31 株转基因植株扩增出与阳性质粒相同的片段, 片段大小为 489 bp, 阴性对照和水对照无扩增片段, 初步证明目的基因已经整合到转基

因玉米植株中。对 T0 代 PCR 阳性植株严格自交, 加代繁殖, 每一世代均进行除草剂筛选和 PCR 检测, 选择 PCR 阳性后代植株自交加代。

2.3 RT-PCR 检测结果

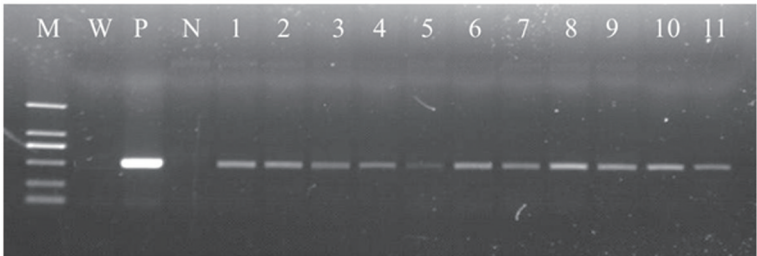
对 PCR 阳性植株提取叶片 RNA 反转录成 cDNA, 针对目的基因序列设计特异引物, 以质粒 DNA 为阳性对照, 非转基因受体合 344 自交系 DNA 为阴性对照, 同时设置水空白对照, 对 31 株 PCR 阳性植株的后代株系进行 RT-PCR 检测。部分扩增产物的电泳检测结果表明(图3), 共有 14 个转基因株系能扩增出与阳性质粒相同的片段, 证明外源基因在转基因玉米中能够正常表达, 阳性率为 45.16%, 阴性对照和水对照无扩增片段。

2.4 转基因玉米苗期盐胁迫处理结果

对 14 个 T4 代 RT-PCR 阳性转基因株系和受体对照自交系进行盐胁迫处理, 幼苗长至 3 叶 1 心期后, 开始用盐溶液浇灌, 连续处理 7 d, 观察记录植株幼苗的表现。转基因株系和对照在非胁迫条件下长

势均良好;在 300 mmol/L NaCl 溶液连续胁迫条件下,随着处理天数的增加,苗的长势变弱,植株矮小细弱,部分叶片萎蔫枯黄。依据付艳的苗情胁迫处理分级方法,根据玉米幼苗在耐盐性鉴定浓度处理下的表现,将玉米幼苗的耐盐性分为高耐、耐盐、中

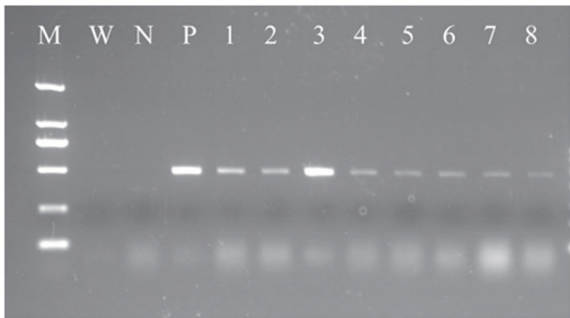
耐、敏感和高感共 5 个级别。研究结果表明,受体自交系合 344 为中度耐盐,2 个转基因株系耐盐性提高两个级别,为高耐;4 个转基因株系耐盐性级别提高 1 个级别,为耐盐;其余 8 个株系耐盐性未提高。



注:M 为 Marker DL2000;W 为水对照;P 为质粒阳性对照;N 为阴性对照;1~11 为转基因植株。
Note: M: Marker DL2000; W: Water; P: Plasmid positive CK; N: Negative CK; Lane 1-11: Transformed plants.

图2 T0代转基因玉米植株的PCR检测

Fig.2 PCR analysis of maize T₀ transformed plants



注:M 为 Marker DL2000;W 为水对照;N 为阴性对照;P 为质粒阳性对照;1~8 为转基因植株。
Note: M: Marker DL2000; W: Water; N: Negative CK; P: Plasmid positive CK; Lane 1-8: Transformed plants.

图3 T1代转基因玉米植株的RT-PCR检测

Fig.3 RT-PCR analysis of maize T₁ transformed plants

3 结论与讨论

采用转基因的方法来提高植物的耐盐碱能力,相比传统的育种方法而言,具有更强的目的性和准确性,并大大缩短育种周期。玉米是遗传转化效率较低的单子叶禾本科作物,比较常用的遗传转化方法有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法。花粉管通道法利用了自然生殖过程完成外源基因的转化,是我国自主创新的转化技术,在棉花、水稻、大豆、小麦及玉米等多种作物中已有大量成功报道。本研究采用外源 DNA 溶液滴加到玉米花丝的方法进行遗传转化,操作技术简便经济,快捷实用。该方法操作中的关键要点是导入时间的确定,本实验在授粉后 18 h 后进行转化操作,并结合考虑温度、湿度等气象因子,利用双受精时卵细胞处于最佳感受态时易于外源 DNA 的进入和整合,从而完成转化。虽

然遗传转化操作对结实率有一定影响,但可通过增加转化的穗数来提高获得转基因后代的频率。

本实验对获得的转 *BDN1* 基因后代植株的每个世代都进行了 PCR 和 RT-PCR 检测,呈现偏分离的态势,不符合孟德尔 3:1 的遗传规律,可能是由于外源基因的多拷贝插入等因素引起的。对苗期耐盐性鉴定中表现高耐的 2 份株系继续进行 Southern blot 检测以确定拷贝数,并将其种植到盐碱池中,评价其产量性状和育种价值。

参考文献:

[1] Mundy J, Chua N H. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene[J]. EMBO J., 1988, 7: 2279-2286.
[2] Close T J. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature[J]. Physiol Plant, 1997, 100: 291-296.
[3] Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, et al. The plant dehydrins: structure and putative functions[J]. Biochemistry, 2003, 68: 945-951.

- [4] Welin B V, Olson A, Palva E T. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced *dhn/lea/rab*-like genes in *Arabidopsis thaliana* L[J]. Heynh. Plant Mol. Biol., 1995, 29(2): 391-395.
- [5] 赵恢武, 刘 晗, 于海源. 耐旱植物厚叶旋蒴苣苔 *BDN1* 脱水素基因的克隆及表达特性分析[J]. 科学通报, 2000, 45(15): 1648-1654.
- Zhao H W, Liu H, Yu H Y. Analysis on the cloning of drought-tolerant plants thick Yip capsule Gesneriaceae *BDN1* gene of dehydration and expression characteristics[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(15): 1648-1654. (in Chinese)
- [6] 邸 宏, 周 羽, 梁广东, 等. 玉米三种不同花粉管通道法转化 *BcBCP1* 基因的初报[J]. 作物杂志, 2012(2): 51-54.
- Di H, Zhou Y, Liang G D, et al. Transformation of *BcBCP1* gene into maize by three different pollen tube pathways[J]. Crops, 2012(2): 51-54. (in Chinese)
- [7] 单长建. 抗逆转基因玉米苗期耐盐碱评价方法的初步建立及功能验证[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [8] 付 艳, 高树仁, 王振华. 玉米种质苗期耐盐性的评价[J]. 玉米科学, 2009, 17(1): 36-39.
- Fu Y, Gao S R, Wang Z H. Evaluation of salt tolerance of maize germplasm in seedling stage[J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(1): 36-39. (in Chinese)
- (责任编辑: 朴红梅)

(上接第31页)

- [11] 程宇坤, 白建荣, 张效梅, 等. 山西省糯玉米自交系的遗传多样性分析及类群划分[J]. 山西农业科学, 2012, 40(5): 433-438.
- Cheng Y K, Bai J R, Zhang X M, et al. Genetic diversity and classification among waxy maize inbred lines in Shanxi[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2012, 40(5): 433-438. (in Chinese)
- [12] 杨 勇, 王鹏文, 张树光. SSR标记在糯玉米遗传多样性研究上的应用[J]. 玉米科学, 2006, 14(6): 62-65.
- Yang Y, Wang P W, Zhang S G. Application of SSR markers in studying genetic diversity of waxy maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(6): 62-65. (in Chinese)
- [13] 陈 坤, 杨昌河. 48份糯玉米自交系遗传多样性的SSR标记[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(1): 1-3.
- Chen K, Yang C H. Genetic diversity of 48 glutinous maize inbred lines[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2010, 38(1): 1-3. (in Chinese)
- [14] 赵文明, 陈艳萍, 孟庆长, 等. 32份糯玉米自交系的遗传多样性分析[J]. 江西农业学报, 2012, 24(12): 6-8.
- Zhao W M, Chen Y P, Meng Q C, et al. Study on genetic diversity of 32 waxy maize inbred lines[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2012, 24(12): 6-8. (in Chinese)
- [15] 王 松. 糯玉米杂种优势与遗传距离关系的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [16] Liu K, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
- (责任编辑: 朴红梅)