文章编号: 1005-0906(2017)03-0023-05

DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20170304

白桦花发育基因 BpMADS3 对玉米的 遗传转化及功能验证

刘励蔚,田 宇,邓艳雪,王振华,邸 宏 (东北农业大学农学院,哈尔滨 150030)

摘 要: MADS-box 基因编码多种具有重要生物学功能的转录调节因子,能够激活或抑制其他基因的转录,在 调节植物根、叶、花和果实的发育尤其在开花植物花的发育过程中起到重要的调控作用。将东北白桦树中克隆得到 的*BpMADS3*基因导入玉米中,验证其在玉米中的功能。结果表明,利用 In-Fushion 技术成功构建了 *BpMADS3*基因 的单子叶植物表达载体 pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3,采用花粉管通道法将该基因导入玉米自交系合 344 中,获 得5个T₂代 PCR和RT-PCR 阳性株系,转基因株系 H1-25和H1-76的散粉期和抽丝期均比对照提前,穗重、穗长、穗 粗和百粒重等产量相关性状显著或极显著高于对照。研究结果初步证明,*BpMADS3*基因的导入对玉米花期提前和 产量增加有一定的功效。

关键词: 玉米; *BpMADS3* 基因; 遗传转化 中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Transformation of Birch Flowering Genes *BpMADS3* into Maize and Functional Verification

LIU Li-wei, TIAN Yu, DENG Yan-xue, WANG Zhen-hua, DI Hong

(Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: *MADS-box* genes, as a transcription factor, played a regulatory role in the development of roots, leaves, flowers and fruit of plants by activating or inhibiting transcription of other genes. This study intends to identify the function of *BpMADS3* gene cloned from Northeast Birch in maize. The results showed that *BpMADS3* gene was successfully inserted into the over-expression vector by the In-fusion cloning technology, named pTF101.1–T–nos–Ubi–BpMADS3. The gene was transformed into maize inbred line He344 by pollen tube pathway. Five T₂–generation lines were positive in PCR and TR–PCR test. The pollinating and silking date of transgenic line H1–25 and H1–76 were shortened compared to the control line. The ear weight, ear length, ear diameter, 100–grain weight of these two lines were significantly higher or great significantly higher than the control. The initial experiment proved that the introduction of *BpMADS3* gene to maize could make the flowing earlier and increase the yield.

Key words: Maize; BpMADS3 gene; Genetic transformation

与花期相关的性状属于数量性状,对玉米的产量具有重要的影响,由多基因共同控制,其遗传规律比较复杂,包括抽雄期、吐丝期、散粉期、散粉至吐丝间隔等^[11]。*MADS-box*类基因编码的多种转录调节因子对植物花的发育起到重要的调控作用,调控机理是激活或抑制其他基因的转录^[21],调节植物根、叶、花和果实的发育,调控植物开花时间,决定植物花分生组织的特性及调控植物花器官的特性,另外还能影响胚珠及果实的发育等^[31]。目前,在玉米中被克隆的*MADS-box*基因已超过30个,他们分别属于不同的基因亚家族。在水稻中也克隆得到了拟南

收稿日期: 2016-10-21

基金项目:国家转基因生物新品种选育重大专项(2016ZX08003003-005)、哈尔滨市科技创新人才研究专项资金(2014 RFQXJ009)

作者简介: 刘励蔚(1992-),硕士,主要从事玉米转基因方面的研 究。E-mail:328474503@qq.com 王振华和邸 宏为本文通讯作者。 E-mail:zhenhuawang_2006@163.com E-mail:dihongdh@163.com

芥 AGL2 的同源基因 OsMADS24、AGL4 的同源基因 OsMADS45 和 GLO-like 基因 OsMADS4 等一系列 MADS-box 基因^[4]。刘焕臻等从东北白桦中克隆得 到 BpMADS3 基因,并构建到植物表达载体 pROKII 中,并利用农杆菌介导法将该基因导入烟草中,结果 表明,BpMADS3 在植株生长过程中起到缩短营养生 长期、提早进入生殖生长期、并增加结实量的作用。

本研究将 BpMADS3 基因构建单子叶植物表达载体,采用花粉管通道法将该基因导入玉米自交系合344中,对得到的转基因植株进行分子验证和功能分析,探讨 BpMADS3 基因在玉米花发育中的作用机制,同时筛选获得营养生长期缩短或产量明显提高等功能显著变化的转基因后代株系,为玉米高产转基因育种提供新种质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米自交系合344由东北农业大学玉米研究所 提供; BpMADS3基因由东北林业大学提供;实验所 用农杆菌菌株 EHA101、含 BpMADS3基因(GenBank No.JX565468)质粒 pROKII-BpMADS3,由东北林业 大学姜静教授提供;植物表达载体 pTF101.1为美国 艾奥瓦州立大学王侃教授馈赠,本实验室在其中添 加了 Ubiquitin 启动子和 T-nos终止子,命名为质粒 pTF101.1-T-nos-Ubi, bar 基因作为选择标记。

1.2 BpMADS3基因单子叶植物表达载体构建

以 pROKII-BpMADS3 为模板进行 PCR 扩增,引 物序列:Primer I:5'-CCCGGGTACCGAGCTCAT-GGGGAAGGGGTAGGGTTCA-3'; Primer II:5'-GGGGAAATTCGAGCTCTCACGTGGCAAAGCATC -CA-3',上、下游引物分别引入 Sac I 酶切位点。 PCR 总反应体系为 20 μL。PCR 反应程序为,94℃ 预变性 5 min,94℃变性 30 s,62℃退火 30 s,72℃延 伸60 s,共进行 30个循环;最后,72℃延伸 10 min。

用限制性内切酶 Sac I 对 pTF101.1-T-nos-Ubi 进行单酶切,37℃酶切2h;利用 DNA 纯化回收试剂 盒对 pTF101.1-T-nos-Ubi 酶切产物及 BpMADS3 基 因 PCR 产物进行回收;利用 Infusion 连接酶对二者 进行连接,5 μ L 连接反应体系;将连接产物转入大 肠杆菌 DH5α感受态细胞中,提取重组子质粒进行 PCR 检测,并将质粒送至吉林省库美生物科技有限 公司进行测序。PCR 检测引物序列:Primer F:5'-ATGGGGAGGGGTAGGGTTCAG-3'。PCR 总反应 体系为20 μ L。PCR反应程序为,94℃预变性5 min, 94℃变性 30 s, 58.5℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s, 共进 行 30个循环;最后, 72℃延伸 10 min。将重组质粒转 化 *E.coli* DH5a 的感受态细胞, 采用碱裂解法大量提 取质粒, 制备浓度为 200 μg/mL DNA 水溶液。

1.3 BpMADS3基因对玉米的遗传转化

采用花粉管通道法转化 BpMADS3 基因,以玉米 自系合344 为遗传转化受体,在玉米花丝抽出10~ 15 cm时进行人工授粉,记录授粉时间,于授粉后9 h 剪去从花丝顶端2~3 cm处剪齐,将花丝装入薄膜 袋中,用1mL注射器将含200 μg/mL质粒DNA的水 溶液从袋口注入薄膜袋底部,使花丝完全浸润在 DNA 溶液中,1 h后复滴1次,秋季按株穗为单位收 获T₀代种子。

1.4 转基因后代的分子验证

收获转基因玉米种子后种植于营养钵中,幼苗 长至3叶期时采用CTAB小量法提取玉米叶片总 DNA。试剂盒提取植物总RNA合成 cDNA,以高温 高压灭菌后 ddH₂O 为空白对照,以非转基因植株 DNA和 cDNA为阴性对照,以pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3重组质粒DNA为阳性对照,进行 PCR和 RT-PCR 扩增,PCR 产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检 测,实验结果利用凝胶成像仪记录。

1.5 转基因后代的功能分析

转基因玉米种子种植于东北农业大学转基因实 验基地,行长2.5 m,株距25 cm,行距70 cm,单株种 植,同常规大田管理。阳性材料为PCR检测呈阳性 的株系,阴性对照材料为PCR检测阴性植株。田间 调查散粉期、抽丝期、雄性分枝数、雄穗主轴长、雄穗 分枝角度的开花相关性状;收获后考查穗重、穗长、 穗粗、轴粗、穗行数、行粒数、百粒重、粒长、粒宽、粒 厚的产量相关性状。

1.6 数据处理与统计分析

实验数据采用Excel 2010进行初步整理,使用 统计分析软件SPSS Statistics 中T检验程序进一步 分析。

2 结果与分析

2.1 BpMADS3基因单子叶植物表达载体构建

将获得的目的基因产物与载体酶切产物利用 Infusion 连接酶进行连接,将重组后的质粒命名为 pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3,利用冻融法转入 到大肠杆菌DH5α感受态细胞中,挑取单菌落及对 应菌液进行PCR检测(图1)。由重组质粒载体和原 始载体pROKII-BpMADS3中均能扩增出732 bp的 目标基因片段。 重组质粒载体pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3 的结构示意图见图2。将PCR阳性质粒送吉林省库 美生物科技有限公司测序,用DNAMAN软件将测序 结果与 BpMADS3 基因原始序列比对,相似度为 100%(图3)。结果表明,已将 BpMADS3 基因重组到 pTF101.1-T-nos-Ubi载体中。



注:M为Trans2K DNA Marker;1为阳性对照pROKII-BpMADS3质粒;2~6为重组质粒pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3。

Note: M, Trans2K DNA Marker; 1, positive control pROKII-BpMADS3 plasmid; 2-6, recombinant plasmid pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3.



- 图1 重组质粒的PCR鉴定
- Fig.1 PCR identification of recombinant plasmid

图2 pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3 载体结构示意图 Fig.2 pTF101.1-T-nos-Ubi-BpMADS3 vector structure



Fig.3 Sequence alignment of BpMADS3 gene in recombinant plasmid and original plasmid

2.2 农杆菌介导法侵染玉米幼胚的遗传转化结果 分析

利用花粉管通道的方法,转化合344自交系共收获12个果穗,共计1548粒种子。对幼苗进行 PCR检测,获得T0代转基因植株68株,56株结实收获种子。对PCR检测阳性的株系繁殖至T2代,T2

代的5个株系PCR检测阳性率符合3:1的分离比, 推测目标基因为单拷贝整合。PCR和RT-PCR检测 结果见图4、图5。阳性对照和转基因株系中均能扩 增出732 bp的目的条带,阴性对照和水对照未扩增 出条带,初步证明*BpMADS3*基因已经整合到玉米基 因组并正常转录。



注:M为Trans2K Plus DNA Marker;P为阳性对照;W为空白对照;N为阴性对照;1~5为转基因株系。

Note: M, Trans2K Plus DNA Marker; P, Positive control; W, Water control; N, Negative control; 1-5, Transgenic maize lines.

图4 T₂代转基因株系PCR检测

 $Fig.4 \quad PCR \ results \ of \ transgenic \ T_2 \ plants$



注:M为Trans2K DNA Marker;P为阳性对照;W为空白对照;N为阴性对照;1~5为转基因株系。 Note: M, Trans2K DNA Marker; P, Positive Control; W, Water control; N, Negative control; 1-5, Transgenic maize lines.

图5 T₂代转基因株系RT-PCR检测

Fig.5 RT-PCR results of transgenic T2 plants

2.3 转基因植株开花相关性状调查结果

调查转基因株系的抽丝期、散粉期以及雄穗主 轴长、雄性分枝数、雄穗分枝角度等开花相关农 艺性状(表1)。以合344为受体的5个转基因株系, 与对照相比散粉期分别提前了1、1、3、0、2d;抽丝期 分别提前了1、2、3、0、1d;吐丝至散粉间隔分别减少 0、1、0、0、-1d;主轴长分别增长-1.36%、2.26%、 17.65%、4.98%和2.71%;雄性分枝数分别增加1.3、 0、1、-1、0.7个;分枝角度分别增加3.0°、1.0°、0°、-7.0° 和-2.0°。转基因株系H1-76的雄穗主轴长显著高 于对照,其他株系的主轴长、雄穗分枝数和分枝角度 与对照差异不显著。

表1 转基因植株开	花相关性状调查结果
-----------	-----------

Table 1 The results of flowering related traits of transgenic plants

株系名称 Strain name	抽丝期(月/日) DTS	散粉期(月/日) DTP	吐丝-散粉间隔(d) ASI	主轴长(cm) Length of main tassel	雄性分枝数(个) Tassel branch	分枝角度(°) Tassel branch angle
H1-25	01/12	01/11	1	21.8±1.2	6.3±0.4	30.0±2.8
H2-26	01/11	01/11	0	22.6±1.4	5.0±0.7	28.0±3.0
H1-76	01/10	01/09	1	26.0±0.2*	6.0±0.7	27.0±5.2
H3-103	01/13	01/12	1	23.2±1.8	4.0±0.0	20.0±3.4
H3-108	01/12	01/10	2	22.7±0.6	5.7±1.1	25.0±2.2
CK(合 344)	01/13	01/12	1	22.1±2.0	5.0±0.7	27.0±5.6

注:*表示在0.05水平下差异显著。

Note: * indicated significant difference at the 0.05 level.

2.4 转基因植株产量相关农艺性状调查结果

测量各阳性转基因株系及阴性对照的果穗及子粒性状,利用 SPSS 19.0 对子粒性状进行独立样本 T 检验分析(表 2)。5 个转基因株系的穗重与对照相比 穗重分别增加 99.09%、97.16%、104.12%、104.86%和

86.94%,差异达极显著水平;株系H1-25、H2-26和H1-76的穗长显著高于对照;株系H1-76、H3-103和H3-108的穗粗极显著或显著高于对照;株系H2-26的行粒数显著高于对照;转基因株系H1-25的百粒重极显著高于对照;其他指标与对照相比均不显著。

表2	转基因株系产	量相关农艺性状调查结果

m 11 A		1. C '	11	1.1	(• . •	1 .
Table 7	The recu	Ite of wi	ماطم	orrolatod	traite of	trancconic n	lonte
$1 a \mu c \Delta$	THE LESU	ILS UL VI	ciu u	ULLELALEU	uans or	nanseeme p	iants
						· · · · · · · · · ·	

株系名称 Line name	穗 重 (g)	穗 长 (cm)	穗 粗 (mm)	穗行数 (行)	行粒数 (粒)	百粒重(g) 100-seed	轴 粗 (mm)	粒 长 (mm)	粒 宽 (mm)	粒厚(mm) Grain
	Ear weight	Ear length	Ear diameter	Ear rows	Row grains	weight	Aix diameter	Grain length	Grain width	thickness
H1-25	48.3±2.4**	10.8±0.8*	32.4±1.6	10±0.0	16±0.0	26.5±3.2**	22.8±1.4	9.0±0.3	8.8±1.2	4.9±0.2
H2-26	47.9±3.1**	12.1±0.2*	30.4±2.0	10±0.0	24±0.0*	20.2±1.8	20.2±0.2	8.5±0.5	7.2±0.6	4.4±0.3
H1-76	49.5±1.2**	9.4±0.2	36.9±1.0**	10±0.0	20±0.8	24.1±1.5*	23.4±0.4	9.7±1.0	8.7±0.7	4.7±0.5
H3-103	49.7±5.2**	9.6±0.4	35.9±2.2*	12±0.0	18±1.0	22.4±3.0	22.9±2.4	9.7±0.2	8.7±1.5	4.2±0.2
H3-108	45.4±3.2**	11.2±1.4*	34.1±3.4*	10±0.0	26±0.0	19.0±0.6	21.4±1.2	7.5±0.6	8.3±0.5	4.5±0.6
СК	24.3±1.8	6.5±0.4	30.3±0.8	10±0.0	16±1.0	19.3±2.6	20.5±1.8	8.6±0.8	8.0±1.4	4.4±0.8

注:*、**分别表示在0.05、0.01水平下差异显著。

Note: * indicated significant at the 0.05 level; ** indicated significant at the 0.01 level.

3 结论与讨论

BpMADS3基因属于AP1/SQUA类植物MADS-box 基因,AP1/SOUA类基因是被子植物所特有的¹⁵,在花 序和花的发展起到非常重要的作用。与双子叶植物 相比,该类基因在少数单子叶植物中也有表达,研究 较为广泛的作物有水稻、玉米和兰花等。对水稻、 大麦和小麦的许多研究表明,AP1/SQUA类基因的 过量表达有利于植物进入生殖生长阶段。在水稻 中,OsMADS18在发芽后4周内能够检测到,并且当 植物到达生殖生长阶段是其表达水平增加。在冬 小麦和大麦中,WAP1基因和BM5基因在生殖生长 阶段的诱导过程中表达水平显著增加19。刘焕臻等 从东北白桦中克隆得到BpMADS3基因,构建到植物 表达载体pROKII中,并采用农杆菌介导法将该基因 导入烟草,结果表明,BpMADS3在植株生长过程中 起到缩短营养生长期、提早进入生殖生长期并增加 结实量的作用。郑唐春¹⁰¹等研究表明,白桦 Bp-MADS3基因主要在花器官中表达,而在早期的营养 组织中不表达,说明白桦 BpMADS3 基因能够调控花 分生组织和花器官的形成,该基因在烟草中的异源 表达提高了烟草中与开花相关基因(NtMADS4、Nt-MADS11、NFL2、NtFUL、NtSOC1)的表达量,导致烟 草提前进入生殖生长。

本实验将 BpMADS3 基因导入到玉米基因组中, 研究该基因对玉米开花相关性状的影响,结果表明,

转基因株系H1-25的散粉期和抽丝期分别比对照提前1d,穗重、穗长和百粒重等产量相关性状显著或极显著高于对照;转基因株系H1-76的散粉期和抽 丝期分别比对照提前3d和2d,穗重、穗粗和百粒重 等产量相关性状显著或极显著高于对照,初步证明 BpMADS3基因的导入对玉米花期提前和产量增加 有一定的功效。

参考文献:

- 王 迪,李永祥,王 阳,等.基于两个相关群体的玉米花期相关 性状QTL定位[J].中国农业科学,2010,43(13):2633-2644.
 Wang D, Li Y X, Wang Y, et al. QTL Analysis of flowering-related traits in maize(*Zea mays* L.) using two connected populations[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(13): 2633-2644. (in Chinese)
- [2] Huang F, Xu G, Chi Y, et al. A soybean MADS-box protein modulates floral organ numbers, petal identity and sterility[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 422-425.
- [3] 刘焕臻. BpMADS3 基因的功能验证[D]. 哈尔滨:东北林业大学 硕士学位论文,2008.
- [4] 张 剑,徐桂霞,薛皓月,等. 植物进化发育生物学的形成与研究进展[J]. 植物学报,2007,24(1):1-30.
 Zhang J, Xu G X, Xue H Y, et al. Foundation and current progress of plant evolutionary developmental biology[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2007, 24(1): 1-30. (in Chinese)
- [5] Shan H, Ning Z, Liu C, et al. Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the AP1/SQUA subfamily of plant MADS-box genes[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44(1): 26-41.
- [6] Zhang Z, Li H, Zhang D, et al. Characterization and expression analysis of six MADS-box genes in maize(Zea mays L.)[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(8): 797-806. (下转第 32页)

- [6] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-bingingprotein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and betaamylase from sweet potatp[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(6): 563–571.
- [7] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199–206.
- [8] Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily its origin in eukaryotes and expansion in plants[J]. BMC Evolutionary Biology, 2005, 5(1): 1–12.
- [9] Wei K F, Chen J, Yang F C, et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the Complete WRKY transcription factor family in maize[J]. DNA Research, 2012, 19(2): 153–164.
- [10] He H, Dong Q, Shao Y, et al. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in Populus trichocarpa[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(7): 1199–1217.
- [11] Yang B, Jiang Y, Rahman M H, et al. Identification and expression

analysis of WRKY transcription factor genes in canola(*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments[J]. Bmc Plant Biology, 2009, 9(1): 68–87.

- [12] Qiu Y P, Yu D Q. Over- expression of the stress- induced Os-WRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis[J]. Environ Exp Bot, 2009, 65(1): 35-47.
- [13] Alexandrova K S, Conger B V. Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass(Dactylis glomerata) [J]. Plant Sci., 2002, 162(2): 301–307.
- [14] 刘龙洲,曲延英,姚源松,等.三种玉米DNA 提取方法探究[J].
 新疆农业大学学报,2003,26(1):31-33.
 Liu L Z, Qu Y Y, Yao Y S, et al. Study on the three extraction methods of total mzize DNA[J]. Journal of Xinjiang Agricul tural University, 2003, 26(1): 31-33. (in Chinese)
- [15] Valliyodan B, Nguyen H T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants[J]. Curr Opinion Plant Biology, 2006, 9(2): 189–195. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)

(上接第27页)

- [7] Lin E P, Peng H Z, Jin Q Y, et al. Identification and characterization of two bamboo(Phyllostachys praecox) AP1/SQUA-like MADS-box genes during floral transition[J]. Planta, 2009, 231(1): 109-120.
- [8] Fornara F, Parenicová L, Falasca G, et al. Functional characterization of OsMADS18, a member of the AP1/SQUA subfamily of MADSbox genes[J]. Plant Physiology, 2004, 135(4): 2207–2219.
- [9] Murai K, Miyamae M, Kato H, et al. WAP1, a wheat APETALA1 homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative to

reproductive growth[J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(12): 1255-1265.

[10] 郑唐春, 臧丽娜, 丁浩, 等. 白桦 BpMADS3 基因的功能分析
 [J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(1): 1-7.

Zhen T C, Zang L N, Ding H, et al. Functional characterization of *BpMADS3* gene from Betula platyphylla[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2014, 36(1): 1–7. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)