

金刚砂辅助农杆菌进行玉米基因转化研究

储 坤, 聂小熊, 冯华鲧, 韩桂丽, 梁雪莲

(仲恺农业工程学院生命科学院, 广州 510225)

摘 要: 对超声波处理方式进行了改进, 在超声波处理时, 加入金刚砂以辅助 *EPSPS* 基因转导到玉米幼胚中。结果表明, 800 粒处理种子播种出苗 93 株, 玉米苗经大田 glyphosate 筛选有 27 株具有抗性, 进行 PCR 电泳检测, 显示 23 株阳性, 初步证明 *EPSPS* 基因已经转化到玉米植株中, 转化率为 29%。金刚砂辅助处理玉米基因转化具有可行性, 利于生产实际操作。

关键词: 玉米; 农杆菌; 金刚砂; *EPSPS* 基因

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Transgenic Corn Research by Emery-assisted *Agrobacterium*-Mediated Transformation

CHU Kun, NIE Xiao-xiong, FENG Hua-jie, HAN Gui-li, LIANG Xue-lian

(College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The ultrasonication-assisted *Agrobacterium* treatment method was modified with the addition of emery to increase the treatment intensity to the apical meristem cells of germinating seeds. Ninety three plants from 800 control seeds were sprayed three times with glyphosate solution, and 27 of them survived, their leaves were taken with a PCR electrophoresis test and 23 shown positive, which suggested that *epsps* gene was introduced into the corn cultivar, and the transformation rate was 29%. Finally, which has been shown that the method has the advantages of circumventing the tedious tissue culture procedures and being easy to apply.

Key words: Corn; *Agrobacterium*; Emery; *EPSPS* gene

Bevan M. 利用农杆菌转化的方法获得了第一例转基因植物^[1]。随着深入研究和科技发展, 逐步清楚农杆菌转化机理。由于转化技术的革新, 农杆菌介导玉米的遗传转化研究取得了阶段性成果^[2-4]。由此逐步建立起玉米、水稻等重要粮食作物的农杆菌转化系统^[5]。除了农杆菌转化法, 多种转化方法也可应用于玉米遗传转化, 如电激转化法、基因枪法等^[6]。由于农杆菌转化法操作简单, 转化费用低, 同时在转移较大 DNA 片段上具有优势, 现已广泛应用于玉米转化研究中^[7]。

农杆菌菌株对不同玉米自交系的侵染能力差异很大。对于不同的玉米自交系, 都各自存在最为敏感的农杆菌菌株^[8,9]。在单子叶植物遗传转化中常用乙酰丁香酮进行诱导, 以提高转化率。由于农杆菌诱导玉米转化的转化率仍然较低, 研究人员使用超声波处理法提高农杆菌对玉米的转化率^[10]。

超声波转基因与其他转基因技术相比具有设备简单, 操作方便, 易于实现连续化、自动化, 样品处理量大, 成本低, 转化率高等优点。利用超声波处理划伤萌发种子和农杆菌介导直接转化植物萌发种子, 均不需要进行组织培养。以划伤萌发幼胚后进行超声波处理的萌发种子为受体, 以携带外源基因片段的农杆菌 Ti 质粒为基因载体, 在植物种子萌发过程中与农杆菌共培养, 使外源基因转移到受体基因组中, 并通过对种子或幼苗的直接筛选, 对植株叶片 DNA 进行 PCR 扩增和 Southern 杂交, 进一步确定转化株是超声波处理萌动种子进行转化的基本思路^[11]。根据农杆菌对受伤组织易感染的特性, 人为

录用日期: 2019-01-01

基金项目: 广东大学生科技创新培育专项基金项目“金刚砂辅助农杆菌进行玉米基因转化创新方法研究”(pdjh2017b0257)

作者简介: 储 坤(1994-), 安徽人, 从事作物生物化学与分子生物学研究。

梁雪莲为本文通讯作者。Tel: 13424101002

E-mail: liangxuelian2005@sina.com

划伤种皮漏出生长点后,再用超声波处理,使其生长点所在的顶端分生组织细胞处于微受伤害后的感受态,可进一步提高转化率并减少嵌合体的形成。

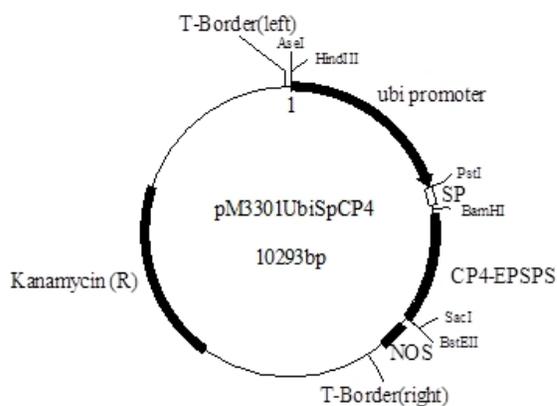
本研究是在利用超声处理萌动玉米种子进行农杆菌转化方法的基础上,再加入金刚砂辅助超声波处理,以增加超声波处理时对玉米种子生长点的刺激强度与刺激方向,加强种子的感受状态,同时减少超声波处理种子的时间。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为仲糯1号,先称取20颗玉米干重,计算出每颗玉米的平均重量,然后估算出1000颗用于实验。

本实验使用的基因表达载体:



菌株为EHA105,在CP4-EPSPS基因设计上上游引物:上-F:CGC AAA TCC TCT GGC CTT TC;下-R:GAC AGG GTT TTC CGA CAC G,大小为1227 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 划胚及金刚砂超声波处理玉米种子

称取20颗玉米,计算出每颗玉米的平均重量并称取出1000颗玉米,然后放于37℃水浴浸泡1d,为接下来的处理做准备。玉米浸泡恢复饱满后,分为实验组和对照组,实验组约800颗,对照组约200颗。然后对实验组进行处理。用手术刀在玉米胚上沿着纵、横两个方向各切1刀,切出1个深约0.5 mm的十字伤口,以刺激生长点;然后将玉米种子放入烧杯中,加入金刚砂和适量水,置于超声波细胞粉碎机进行处理,扩大伤口。超声波的设置参数为功率800 W,工作10 s,休息3 s,循环3次。对照组不做特别处理。

1.2.2 加菌液共培养

把处理好的玉米分装到广口瓶中,加入已培养

好的对数成长期的农杆菌菌液与相应乙酰丁香酮(AS),封口,放入摇床,室温侵染12 h。对照组的玉米也分装到广口瓶中,但不加入菌液。实验组与对照组一起放到摇床培养。

1.2.3 播种及筛选

与菌液共培养后,用清水洗去玉米上残留的菌液,把玉米均匀地铺在篮子中。篮子中先垫1层锡纸,然后在锡纸上铺1层纸巾,用水浸湿,使玉米在运送过程中不至于失水过多。把玉米播种到田里,共播种4陇,实验组的播种到中间两陇,对照组的播种到旁边的两陇。每隔一段时间,对田里的玉米喷洒草甘膦。

1.2.4 收获

种植3个月后,即可收获成熟玉米。把收获的玉米晒干,分别对实验组和对照组的玉米进行编号,收获的实验组编号从a~z和A,共计27个,对照组编号从1~7共计7个。分别剥下玉米粒,装入塑料袋中,做好标记。

1.2.5 分子检测

用SDS法提取幼苗DNA,PCR反应体系见表1,反应程序见表2,最后结果水平电泳检测。

表1 PCR反应体系

Table 1 The system of PCR

PCR反应材料 Culinary of PCR	体积(μL) Volume
ddH ₂ O	13.0
10×Taq buffer	2.0
dNTPs	0.5
引物1	1.0
引物2	1.0
模板DNA	2.0
TaqDNA聚合酶	0.5
总体积	20.0

表2 PCR反应过程

Table 2 The reaction process of PCR

步骤 Step	温度 Temperature	时间 Time	反应过程 Process
Step 1	94℃	5 min	预变性
Step 2	94℃	1 min(变性)	Step 2 to 4 30个循环
Step 3	55℃	45 s(复性)	
Step 4	72℃	1 min(延伸)	总延伸
Step 5	72℃	10 min	
Step 6	4℃	Hold	结束

1.2.6 结果统计

出苗率=实际出苗数/播种种子数×100%;

抗性率=PCR阳性株/大田筛选植株数×100%;

转化率1=PCR阳性株/处理种子数×100%;

转化率2=抗性株数/实际出苗数×100%。

2 结果与分析

2.1 转化处理后T0代玉米获得

2.1.1 划胚及金刚砂超声波处理玉米种子

称取20颗玉米,计算出每颗玉米的平均重量并称取出1 000颗玉米,然后放于37℃水浴浸泡1 d (图1)。

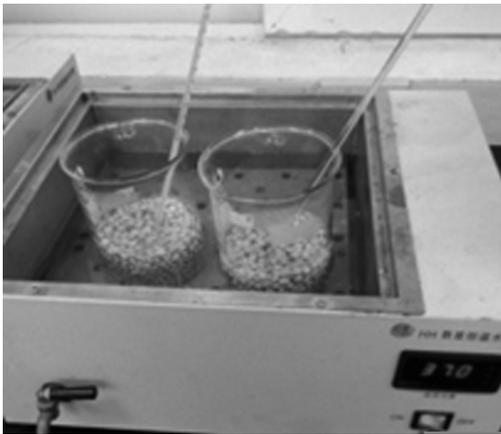


图1 水浴使玉米种子萌动

Fig.1 Soaking treatment

玉米浸泡恢复饱满后,分为实验组和对照组,然后用手术刀对实验组进行划胚及加入金刚砂的超声波处理(图2、图3)。



图2 划胚操作

Fig.2 Scratching embryo of seed



图3 超声波、金刚砂处理玉米种子

Fig.3 Treating by ultrasonic with emery

2.1.2 加菌液共培养

处理好的玉米分装,并加入菌液与AS后摇床培养(图4、图5)。

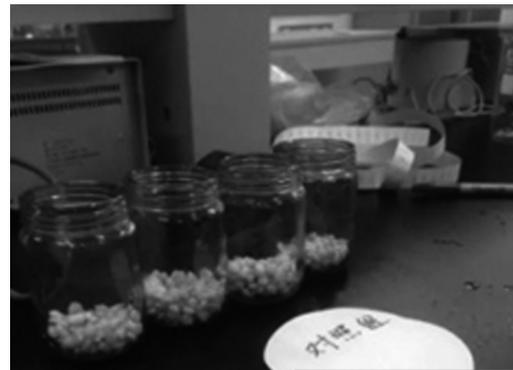


图4 对照组玉米种

Fig.4 Control seed

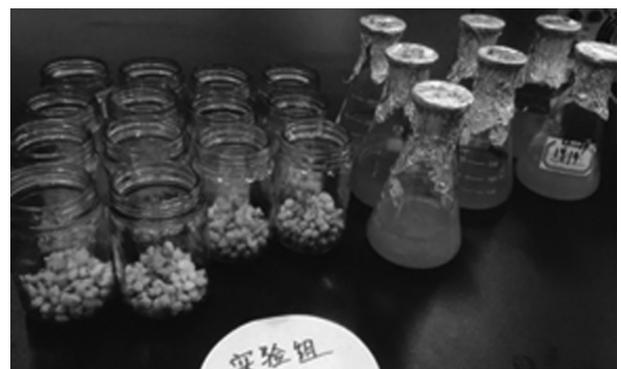


图5 实验组玉米种

Fig.5 Treated seed

2.1.3 播种

与菌液共培养后,用清水洗去玉米上残留的菌

液,把玉米均匀地铺在篮子中。运送到试验田后播种到大田里(图6、图7)。



图6 玉米保湿运输

Fig.6 Corn moisturizing transportation



图7 播种

Fig.7 Sowing

2.1.4 筛选与收获

定时对田里的玉米喷洒草甘膦(glyphosate)。

第2周:配制1.5:1 000浓度的草甘膦除草剂,对实验组玉米进行均匀喷洒。

第4周:观察玉米的生长状况,拍照记录;然后配制3:1 000浓度的草甘膦除草剂对实验组玉米进行均匀的雾状喷洒。

第8周:重复第4周实验步骤。

第12周:收获玉米见图8。

大田统计结果,200颗对照出苗147株;800颗处理出苗93株,经过大田草甘膦筛选得到27株玉米。

未处理玉米种子出苗率=对照组出苗数/对照组播种数=147/200=73.50%

处理玉米种子出苗率=实验组出苗数/实验组播种数=93/800=11.63%



A:实验组玉米 A: Treated corn



B:对照组玉米 B: Control corn

图8 收获玉米图

Fig.8 Corn harvest

2.2 T1代转化玉米种苗的检测

2.2.1 T1代种苗

取足够数量的培养皿,在每个培养皿上铺1层纸巾,润湿。从各个编号的玉米中各取10颗T1代颗粒饱满的种子,均匀地放置到培养皿上,并在培养皿上写上该玉米的编号(图9)。

2.2.2 T1代DNA提取

种植2个星期,等T1代玉米苗长到约10 cm高、有2~3片叶时,利用SDS提取植物DNA的方法提取T1代玉米苗叶片上的DNA(图10)。

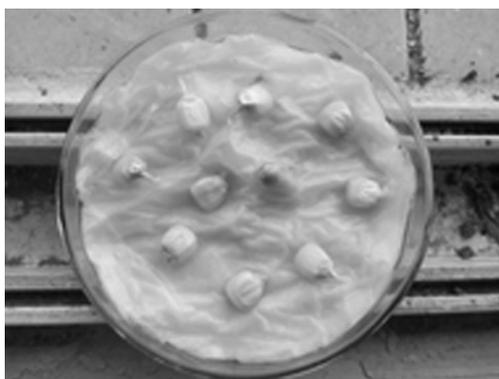


图9 种植T1代种子
Fig.9 T1 Seeds

带,所有条带大致成1条直线,此条带即为玉米的总DNA带。但条带不是特别清晰,有一定程度的降解和拖带现象,同时可能由于杂质影响,令条带不整齐,也可能是核酸酶污染引起DNA降解。

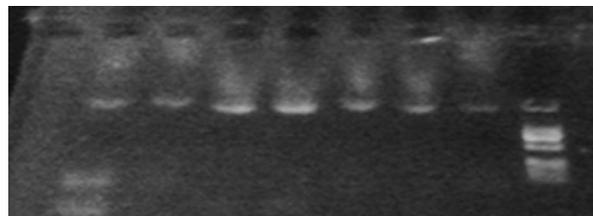


图11 部分T1代样品 DNA电泳结果
Fig.11 DNA of the T1



图10 种植2个星期的T1代玉米苗
Fig.10 T1 seedlings planted for 2 weeks

图12显示,经过PCR体外扩增处理后,实验组的大部分电泳结果出现了1条约1200bp大小的条带,只有e、O、p、A 4个处理为阴性。由此可得,经金刚砂处理后,实验组玉米能够成功地转入CP4-EP-SPS草甘膦抗性基因。

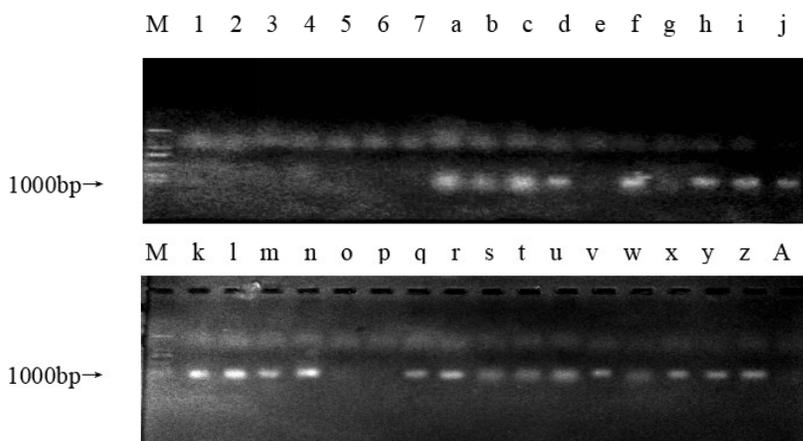
抗性率=PCR阳性株/大田筛选植株数×100%=23/27=85.19%;

转化率1=PCR阳性株/处理种子数×100%=23/800=2.88%;

转化率2=抗性株数/实际出苗数×100%=27/93=29%。

结果表明,金刚砂辅助超声波进行玉米农杆菌转化具有可行性。

由图11所示,实验组和对照组都能看到1条条



注:M为Marker;1~7为对照;a~A为处理,其中e、O、p、A为阴性。
Notes: M, Marker; 1-7, Control; a-A, Treatment, among them, e, O, p, A are negative.

图12 T1代PCR电泳结果
Fig.12 PCR of the T1

3 结论与讨论

自然状态下,直接用农杆菌对玉米幼胚愈伤组

织进行介导的转化率极低,一般为0.1%~0.3%。研究者经过不断条件优化后一直停留在5%~30%的转化率,其中,高的转化率直接与玉米的特殊基因型

有关^[12]。非组培转化方法(包括花粉管通道法、萌动种子法等)的出现,主要为避开基因型与冗长组培过程带来的问题,提高转化效率。梁雪莲、孙毅^[13]等利用划胚法处理萌动玉米种子,得到了结果稳定的转基因玉米,并使农杆菌侵染的抗性率达到30%以上。张丽君等^[14]通过超声波处理玉米种子的方法,在900 W超声波的强度下处理10 min,使农杆菌侵染的成活率达到80%以上。

本研究结合前人研究成果,对萌动种胚转化方法进行改良实验,即在超声波处理划伤萌动种子的基础上加入了金刚砂。金刚砂在超声波的震荡下,不断进行无规则运动,不断对玉米种子生长点进行摩擦,加大了对玉米种子生长点的物理刺激,使玉米种子能较长时间保持感受状态。

经金刚砂处理后,玉米种子的出苗率较低,为11.63%,但抗性率高达85.19%。农杆菌的转化率如果按照最严格的PCR阳性株/处理种子数为2.88%;如果比照常愈伤组织转化中使用的抗性植株数/转化的外植体总数 $\times 100\%$ 。本实验应该采用大田筛选抗性植株数/实际出苗数 $\times 100\%=29\%$,尽管没有超过前人的30%,但此法无需组培,也与玉米基因型无关,操作简便,处理时间快,很有利于大量大田生产,提高工作效率。另外,超声波处理时会不断产生热量,使介质的温度升高,会对种子产生一定的热化作用,长时间处理会对外植体造成较大伤害。加入金刚砂后,提高了对生长点的刺激作用,同时大大减少了超声波的处理时间,避免热化作用对种子的损伤。

参考文献:

- [1] Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(22): 8711-8721.
- [2] Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. Agrobacterium mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter beta-glucuronidase gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(3): 491-506.
- [3] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, 6(2): 271-282.
- [4] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(6): 745-750.
- [5] 杨爱国. 玉米胚性愈伤遗传转化体系优化及基因工程雄性不育系初步研究[D]. 雅安:四川农业大学,2006.
- [6] 张素芝,荣廷昭. 农杆菌介导的玉米遗传转化系统研究进展[D]. 雅安:四川农业大学,2006.
- [7] 张 荣,王国英,张晓红,等. 根癌农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 19(1): 45-48. Zhang R, Wang G Y, Zhang X H, et al. Establishment of maize genetic transformation system mediated by agrobacterium tumefaciens[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, 19(1): 45-48. (in Chinese)
- [8] 权瑞党,尚 梅,张举仁. 农杆菌介导的玉米自交系愈伤组织转化条件的优化[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(3): 245-250. Quan R D, Shang M, Zhang J R. Optimization of agrobacterium-mediated callus transformation conditions of corn inbred lines[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(3): 245-250. (in Chinese)
- [9] 黄 璐,卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织DNA的差异[J]. *植物生理学报*, 1999, 25(4): 332-338. Huang L, Wei Z M. Regeneration ability and DNA difference between embryogenic and non-embryogenic callus of different genotypes of maize[J]. *Acta Plant Physiology*, 1999, 25(4): 332-338. (in Chinese)
- [10] Smith R H, Hood E E. Review and interpretation: Agro-bacterium tumefaciens transformation of monocots[J]. *Crop Sci.*, 1995, 35(2): 301-309.
- [11] 孙 毅. 超声波辅助农杆菌介导植物萌发种子基因转化方法[P]. 中国专利:201110095852.X.2011.
- [12] 张 瑜,鄢家俊,白史且,等. 农杆菌介导和本科植物遗传转化的研究进展[J]. *草业与畜牧*, 2016(4): 4-9. Zhang Y, Yan J J, Bai S Q, et al. Research progress in Agrobacterium-mediated and genetic transformation of undergraduate plants [J]. *Grass and Animal Husbandry*, 2016(4): 4-9. (in Chinese)
- [13] 梁雪莲,孙 毅,郭平毅. 农杆菌组培及三种非组培法在小麦和玉米上转化外源Bar基因研究[D]. 山西农业大学,2002.
- [14] 张丽君,刘龙龙,张建珍,等. 农杆菌介导创伤胚转化的应用[D]. 安徽农业科学,2015.

(责任编辑:朴红梅)