

文章编号:1005—0906(2011)05—0052—03

农杆菌侵染玉米萌动胚转化抗逆基因 *BcBCP1*

周 羽,卢翠华,王振华,梁广东,单长建,张 慧,邸 宏

(东北农业大学农学院,哈尔滨 150030)

摘 要:以 5 份优良玉米自交系为试材,采用农杆菌侵染玉米萌动胚的方法转化蓝铜蛋白类似基因 *BcBCP1*,同时优化遗传转化体系。结果表明,菌液浓度为 OD₆₀₀=0.8、侵染 24h、共培养 3 d 时,遗传转化率分别达到最高;不同基因型的遗传转化率存在差异,其中丹 598 转化率最高,达到 6.67%;丹 599 的遗传转化率最低,为 0.56%,5 个不同基因型的平均遗传转化率为 2.13%。共获得 PCR 阳性植株 43 株,其中 28 株结实。

关键词:玉米;萌动胚;农杆菌;*BcBCP1* 基因

中图分类号:S513.035.3

文献标识码:A

Introduction of *BcBCP1* Gene Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens* into Germinating Embryo of Maize

ZHOU Yu, LU Cui-hua, WANG Zhen-hua, LIANG Guang-dong, et al.

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

Abstract: *BcBCP1* gene was introduced into 5 maize inbred lines by *Agrobacterium Tumefaciens* pathway using germinating embryo as receptor and the influence factors of genetic transformation was optimize at the same time. The results indicated that the rate of transformation reached the maximum when the concentration of bacterium was OD₆₀₀ was 0.8, the infection time was 24h and the co-cultivation time was three days. There were different transformation rates among maize genotypes and the average of it was 2.13%. Forty-three transformed plants were positive by PCR, and 28 plants among them were seed.

Key words: Maize; Germinating embryo; *Agrobacterium tumefaciens*; *BcBCP1* gene

转基因技术可以打破物种界限,对基因进行定向改造和重组,对品种的抗性、品质、产量等性状进行协调改良,在缓解资源限制、保障粮食安全和保护生态环境等方面具有重要的价值。

厚叶旋蒴苣苔(*Boea crassifolia*)是苦苣苔科旋蒴苣苔属植物,主要分布在中国西南部的具石灰岩地貌的地区,是一种极其耐旱的植物,它能在极端的条件下生存下来。*BcBCP1* 基因是从厚叶旋蒴苣

苔属植物中克隆到的一个编码区为 606 bp 的干旱相关的蓝铜蛋白类似基因^[1],受干旱诱导表达强烈,编码一条由 201 个氨基酸组成的蛋白质,在氨基酸的末端具有一个信号肽,中部具有一个 Cu²⁺ 结合的结构域,羧基末端含有一个植物细胞壁伸展蛋白所特有的 PPR 结构,具有典型的小分子量蓝铜蛋白的结构特征^[2]。这种蛋白的结构推测与植物光合作用的电子传递和植物在干旱、盐碱、高温、低温等逆境条件下的信号传递及植物体内活性氧的清除有关,从而提高植物的抗逆能力。

本研究采用农杆菌侵染萌动胚的方法将 *BcBCP1* 基因转化优良玉米自交系,建立高效稳定的玉米遗传转化体系,获得抗逆转基因玉米新种质,为抗逆转基因玉米育种提供材料支撑和技术支撑。

收稿日期:2010-08-07

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08003-015B)、黑龙江省青年基金项目(QC2009C54)、黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-Q08137)

作者简介:周 羽(1985-),女,硕士,主要从事玉米遗传转化方面的研究。

邸 宏为本文通讯作者。E-mail: dihongdh@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

受体材料为优良玉米自交系黄早四、丹 599、丹 598、丹 340 和 K10,由东北农业大学玉米研究所提供。

实验采用农杆菌菌株 LBA4404,质粒载体 p3300—*BcBCP1*,启动子为 *CaMV35S*,终止子为 *nos*,筛选标记为 *bar* 基因,由北京大学林忠平教授提供。

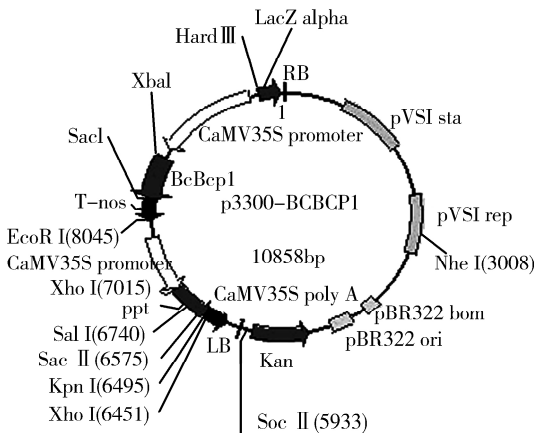


图 1 p3300—植物表达载体质粒图谱

Fig. 1 Map of construction of p3300-BcBCP1 expression plasmid

1.2 遗传转化方法

选用饱满的自交系种子,用 70% 酒精浸泡 10 min,0.1% 升汞消毒 10 min,无菌水冲洗 3~5 次,在超净台里用解剖刀在玉米胚上小心的划开约 1~3 mm 的口子,然后将种子浸泡在无菌水中,置于 37℃ 水浴中约 4~5 h,备用。

将培养至对数生长期的农杆菌离心后重悬于含有 100 μmol/L 乙酰丁香酮 AS 的 MS 液体培养基中,分别调整 OD₆₀₀ 值为 0.6、0.8、1.0;把准备好的玉米萌动胚放入液体培养基中,28℃、220 r/min 继续振荡 12、18、24 h;然后把种子放在 MS 固体培养基上分别共培养 2、3、4 d,洗净培养基后将种子播入营养钵中,钵下部为土壤,上部为 7~9 cm 的蛭石,隔天浇培养液或水;植株长到 3 叶期,均匀喷洒除草剂 1%PPT 水溶液行筛选。

除草剂抗性植株提取总 DNA,进行 PCR 检测。引物序列为 P I: 5'-ATGGGGGGACTCAAG-GTTTTTGCT-3', P II: 5'-CACAGCTTTGAAT-GTGTGTTGATTTG-3'。

PCR 反应程序为 95℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共进行 35 个

循环;72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪记录实验结果。

2 结果与分析

2.1 遗传转化体系优化的结果

以自交系 K10 为试材,针对玉米萌动胚转化体系的菌液浓度、侵染时间和共培养时间分别设置了 3 个不同水平,进行体系的优化。

由图 2、图 3 和图 4 可见,当菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.8、侵染 24 h、共培养 3 d 时,遗传转化率分别达到最高。

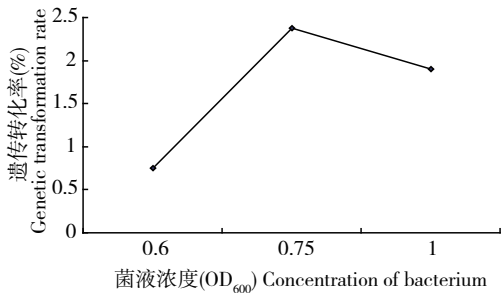


图 2 菌液浓度对遗传转化率的影响

Fig. 2 Effects of concentration of bacterium on genetic transformation rate

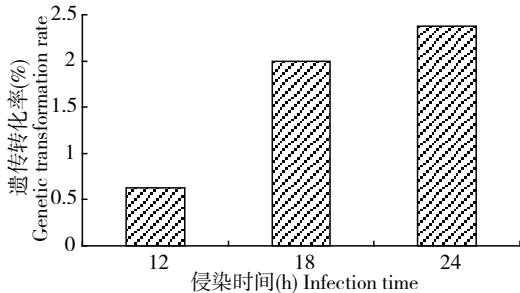


图 3 侵染时间对遗传转化率的影响

Fig. 3 Effects of infection time on genetic transformation rate

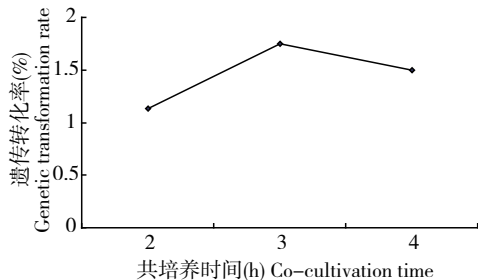


图 4 共培养时间对遗传转化率的影响

Fig. 4 Effects of co-cultivation time on genetic transformation rate

2.2 不同基因型转化率的差异

按照优化的遗传转化体系,对黄早四、丹 599、

丹 598、丹 340 和 K10 进行 *BcBCP1* 基因的遗传转化,根据 PCR 结果进行统计遗传转化率。出苗率=出苗数/侵染子粒数×100%;转化率=PCR 阳性植株数/侵染子粒数×100%。研究表明,在农杆菌侵染玉米萌动胚的遗传转化中,不同基因型的遗传转

化率存在差异,其中丹 598 转化率最高,达到 6.67%;丹 599 的遗传转化率最低,为 0.56%,5 个不同基因型的平均遗传转化率为 2.13%(表 1)。共获得 PCR 阳性植株 43 株,其中 28 株结实,PCR 检测结果见图 5。

表 1 出苗率与转化率统计结果

Table 1 The statistic result of the rate of emergence and transformation

基因型	处理子粒数(粒)	出苗数(株)	PCR 阳性植株数(株)	出苗率(%)	转化率(%)
Genotype	No. of treated seeds	No. of plants	No. of PCR positive plants	Rate of emergence	Rate of transformation
黄早四	600	312	6	52.00	1.00
丹 599	180	96	1	53.33	0.56
丹 598	120	102	8	85.00	6.67
丹 340	120	50	2	41.67	1.67
K10	1000	632	26	63.20	2.60
平 均				59.01	2.13

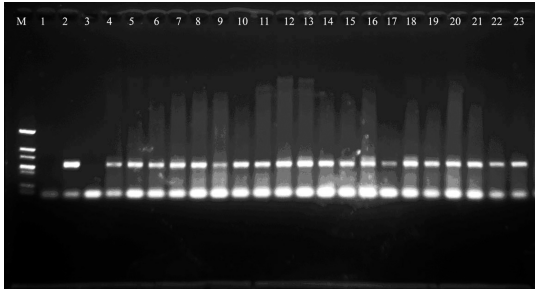


图 5 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR detection of putative transformant
注:M 为 DL2000 marker;1 为阴性对照;2 为质粒阳性对照;
3 为水空白对照;4~23 为转基因株系。
Notes: M;DL2000 marker;
1: Negative control;2: Positive control;
3: Water control;4-23: Putative plants.

3 结论与讨论

目前,应用于玉米遗传转化最多的外植体是幼胚,其优点是容易产生胚性愈伤组织,且易于分化再生成苗,直接以幼胚作为农杆菌介导转化的受体已经取得巨大成功^[3,4]。但该方法以组织培养为基础,操作技术性要求较高,步骤繁琐,且取材受玉米生长季节的限制,遗传转化率较低。农杆菌侵染玉

米萌动胚进行遗传转化是近几年刚刚发展起来的技术^[5]。本研究应用该转化体系将抗逆基因 *BcBCP1* 转入 5 个玉米骨干自交系中,平均遗传转化率达到 2.13%,无需进行大量繁琐的组织培养步骤,且取材方便,一年四季均可进行,有利于进行大批量的遗传转化,为规模化的玉米转基因提供了可能。

参考文献:

[1] 赵恢武,刘 晗,于海源,等. 耐旱植物厚叶旋蒴巨苔 BDNI 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.
[2] 胡鸢雷,吴韩英,王晓丽,等. 从极端环境下生长的物种中克隆基因用于提高植物的抗逆性[C]. 全国植物生物技术及其产业化研讨会论文摘要集,2007.
[3] 邸 宏,卢翠华,王振华,等. 农杆菌介导 *bar* 基因转化玉米幼胚的研究[J]. 东北农业大学学报,2008,39(2):150-154.
[4] Zhao Z,Gu W,Cai T, et al. High throughput genrtic transformation mediated by *Agrobacterium Tumefaciens* in maize[J]. Mol. Breed, 2001,8:323-333.
[5] 王昌涛,赵玉锦,李坤远,等. 农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化新体系的建立[J]. 华北农学报,2007,22(5):110-113.

(责任编辑:朴红梅)