

文章编号: 1005-0906(2011)03-0056-03

农杆菌侵染玉米芽尖转化 *BcWRKY1* 转录因子基因的初报

梁广东, 卢翠华, 王振华, 周 羽, 单长建, 邸 宏

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 以玉米自交系鲁 9801、K10 芽尖为受体, 采用农杆菌介导法转化 *BcWRKY1* 转录因子基因, 同时优化了遗传转化体系。结果表明, 乙酰丁香酮浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、0.05 个大气压下真空处理侵染 10 min 转化率最高。实验共筛选出 98 株除草剂抗性植株, 其中 23 株 PCR 呈阳性, 18 株结实。

关键词: 玉米; 农杆菌; *BcWRKY1* 基因; 芽尖

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Introduction of *BcWRKY1* Gene Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens* into Shoot Tip of Maize

LIANG Guang-dong, LU Cui-hua, WANG Zhen-hua, ZHOU Yu, SHAN Chang-jian, DI Hong

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

Abstract: *BcWRKY1* gene was introduced into 7 maize inbred lines by pollen tube pathway and optimize the influence factors of genetic transformation. The results indicated that the transformation method with 100 $\mu\text{mol/L}$ AS in the medium combined with vacuum at 0.05 Mpa for 10 min was beneficial to improve the transformation rate. Ninety eight maize plants resisted to herbicide, among which 23 plants showed positive PCR reaction. Eighteen transformed plants were seed.

Key words: Maize(*Zea mays* L.); *Agrobacterium Tumefaciens*; *BcWRKY1* gene; Shoot tip

目前, 世界上许多国家都将发展转基因玉米作为满足玉米增长需求的重要途径。截止 2007 年全球转基因玉米种植国家达到 16 个, 转基因玉米的种植面积达到 3 520 万 hm^2 , 涉及到的基因主要有抗虫、抗除草剂、抗病、抗逆和品质改良基因等。我国已经开展了大量转基因玉米的研究, 初步获得了多种具有自主知识产权的基因和转基因新材料, 已经建立了多种玉米遗传转化体系, 基因枪、农杆菌介导、花粉管通道法等转化方法长期以来也有深入的研究^[1~3], 并且国外一系列的转基因玉米产品已经投入农业生产, 但玉米的遗传转化仍然十分困难, 没有一

套规范的被广泛使用的转化体系。

本研究以玉米自交系鲁 9801 和 K10 为试材, 采用农杆菌侵染芽尖的方法转化 *BcWRKY1* 转录因子基因, 通过对材料基因型、转化条件等因素的综合研究, 优化遗传转化体系, 为玉米抗逆转基因育种提供技术支撑和材料支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用优良玉米自交系鲁 9801 和 K10, 由东北农业大学玉米研究所提供。

实验用农杆菌菌株 LBA4404, 质粒载体 p3300-Ubi-WRKY1, 筛选标记为 *bar* 基因, 启动子为 *ubi*, 终止子为 *nos*, 由北京大学林忠平教授提供(图 1)。

1.2 实验方法

选用饱满的玉米自交系种子, 经常规消毒接种于 MS 培养基, 暗培养, 待芽长至 4 ~ 5 cm 后剥取茎尖, 并用解剖刀轻微挫伤茎尖, 放入无菌培养皿中。

收稿日期: 2010-05-19

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: 梁广东(1980-), 男, 硕士, 从事玉米遗传转化研究。

邸 宏为本文通讯作者。E-mail: dihongdh@163.com

将培养至对数生长期的农杆菌菌液离心后重悬于含有乙酰丁香酮的液体 MS 培养基中,在 0.05 个大气压下,侵染芽尖 10、20、30 min。

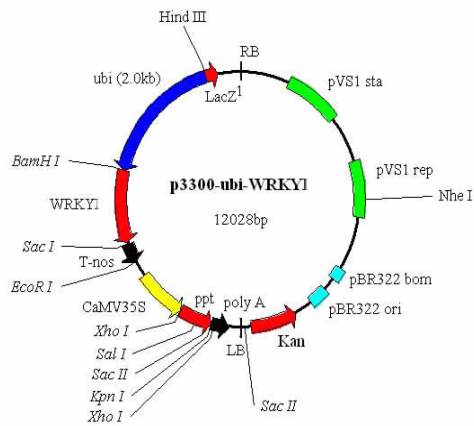


图 1 p3300-Ubi-WRKY1 植物表达质粒结构示意图

Fig.1 Map of construction of p3300-Ubi-WRKY1 expression plasmid

用无菌滤纸吸干多余菌液,将子粒接种至 MS 固体培养基中,22℃~24℃条件下黑暗培养 3 d 后移栽到营养钵中。钵下部为土壤,上部为 7~9 cm 的蛭石,隔天浇培养液或水。待植株长到 3 叶期,均匀喷洒除草剂 PPT 水溶液进行筛选。抗性植株提取叶片的总 DNA 进行 PCR 检测。上游引物为 primer I : 5'-GAGCCCACTGATTTTCTTG-3',下游引物为 primer II : 5'-ATGTCGTCTCTCGGCTCATC-3'。PCR 反应程序为:95℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共进行 29 个循环;72℃延伸 10 min,4℃终止反应。

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 真空处理时间对转化率的影响

以自交系 K10 为试材,将剥离后的茎尖置于菌

液中后,在抽真空 0.05 个大气压干燥器中感染 0、10、20、30 min,以除草剂抗性植株占出苗数的百分比来计算转化率。转化率 = 抗性植株 / 移栽植株数 × 100%。图 2 结果显示,抽真空侵染 10 min 转化率最高,达 18.6%。

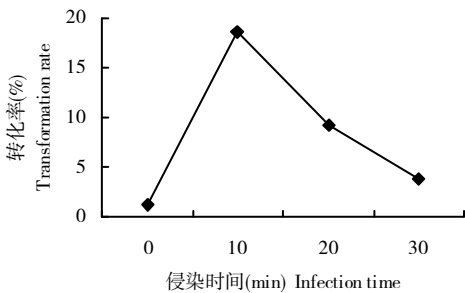


图 2 真空处理时间对 K10 转化率的影响

Fig.2 Effects of treating time on transformation frequency of K10

2.2 乙酰丁香酮对玉米芽尖转化的影响

以自交系 K10 为试材,在农杆菌菌液中添加不同浓度的乙酰丁香酮(AS)。从图 3 可以看出,100 μmol/L 和 150 μmol/L 的乙酰丁香酮都能显著提高 T-DNA 转移效率(转化率都超过 15%)。由于乙酰丁香酮是一种酚类物质,太高的浓度会对植物组织有伤害作用,对愈伤组织诱导有害,因此本实验中使用乙酰丁香酮的适宜浓度为 100 μmol/L。

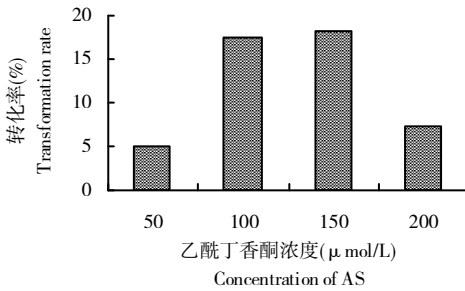
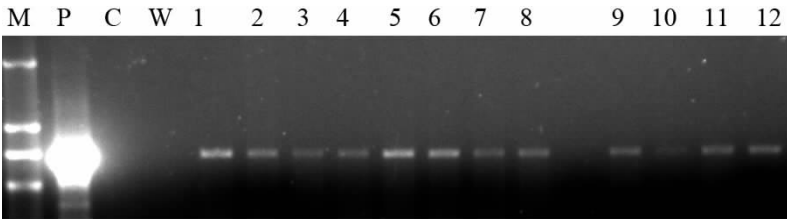


图 3 乙酰丁香酮对 K10 转化率的影响

Fig.3 Effects of AS on transformation frequency of K10

2.3 转基因玉米的 PCR 结果



注:M 为 Marker(DL2000);P 为阳性对照;C 为阴性对照;W 为水对照;1~12 为转基因植株。

Note: M: DNA Marker (DL2000); P: Positive CK; C: Negative CK; W: Water CK; 1-12: transgenic maize plants

图 4 转基因植株的 PCR 检测

Fig.4 PCR analyses of transgenic plants

对自交系鲁 9801 和 K10 进行农杆菌侵染芽尖的遗传转化,共获得除草剂抗性植株 98 株,其中鲁 9801 获得 58 株,K10 获得 40 株。PCR 检测结果显示,23 株除草剂抗性植株 PCR 显阳性,扩增出

1 300 bp 与阳性对照相同的目的片段,阳性对照和空白对照未扩增出条带,说明 *BcWRKYI* 基因已整合到玉米基因组中(图 4)。由于受到气候和人为因素的影响,18 株转基因玉米获得种子(表 1)。

表 1 不同基因型玉米的转化率
Table 1 Transformation frequency of different genotypes maize

自交系	侵染粒数(粒)	出苗数(株)	出苗率(%)	除草剂抗性植株数(株)	PCR 阳性数	结实株数(株)
Inbred line	Infected grains	No. of seedling	Emergence rate	No. of herbicide-resistant plants	Positive No. of PCR	No. of plant seed
鲁 9801	579	506	87.4	58	15	12
K10	380	296	77.9	40	8	6

3 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,已经取得成功^[4]。农杆菌介导玉米茎尖进行遗传转化是近几年刚刚发展起来的技术。Zhang 等^[5]用基因枪轰击玉米芽尖分生组织,将 *Gus* 基因导入玉米中,经检测基因已整合到玉米基因组中。李国圣等^[6]采用基因枪转化玉米芽尖分生组织诱导胚状体和丛生芽,将抗除草剂基因 *als* 导入玉米细胞,PCR 检测和 Southern 杂交表明,再生植株导入了 *als* 基因。研究表明,农杆菌介导玉米茎尖进行遗传转化可有效弥补胚性愈伤诱导对基因型的限制,并且取材方便,一年中任何时期都可进行,玉米茎尖移栽成活率高,可以提高转化率,同时还可以进行室内抗性植株筛

选,利于进行大批量的遗传转化。

参考文献:

[1] 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.

[2] 邸 宏,卢翠华,王振华,等.*Bar* 基因的玉米花粉管通道法转化[J].中国农学通报,2008,24(2):89-92.

[3] 刘昭军,卢翠华,王振华,等.玉米花粉管通道法转化几丁质酶基因的研究[J].江苏农业学报,2008,24(增刊):80-83.

[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] Zhang S, Warkentin D, Sun B, et al. Variation in the inheritance of expressionamong subclones for unselected(uidA) and selected(bar) transgenes in maize(*Zea mays* L.)[J]. Theor. Appl. Genet., 62(6): 752-761.

[6] 李国圣,张卿伟,张举仁,等.玉米丛生芽体系的建立及抗除草剂转基因植株再生[J].中国科学(C 辑),2001,31(5):385-391.

(责任编辑:朴红梅)