

文章编号: 1005-0906(2007)03-0026-04

香白糯玉米农杆菌转化体系的建立

梁雪莲, 梁 红, 朱建标, 苏杏妹, 曾慕衡, 王晓明, 张 璧

(仲恺农业技术学院, 广州 510225)

摘 要: 实验以香白糯玉米为供试材料, 通过不同的培养条件比较优化玉米胚植株再生体系, 考察不同胚龄、不同的培养基对糯玉米幼胚的愈伤诱导、分化、成苗的影响。用根癌农杆菌 GV3850 介导转化了 *CpTI* 和 *Bar* 基因, 获得 5 株 PCR 和 Southern 杂交表现阳性的植株, 建立了农杆菌在香白糯玉米上的基因转化体系。

关键词: 香白糯玉米; 幼胚; 愈伤组织; 根癌农杆菌

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

The Optimization of Regeneration System from Maize Embryo and the Research of the Agrobacterium Transformation

LIANG Xue-lian, LIANG Hong, ZHU Jian-biao, et al.

(Life Science College, Zhongkai University of Agricultural and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The paper got the optimized regenerative system from immature embryo by comparing the different tissue culture mediums and examining the infection rate in different phases of different aged maize embryos. The experiment used the agrobacterium tumefaciens GV3850 to transfer Guangnuo maize and obtained 5 positive transgenic plants by PCR and Southern-blotting.

Key words: Glutinous maize; Immature embryos; Callus; Agrobacterium tumefaciens

农杆菌介导法进行基因转化通常是利用根癌农杆菌介导植物的胚性愈伤组织, 如介导玉米幼胚愈伤组织使其成为转基因作物。不同发育时期的幼胚, 离体培养成功率差异很大。一般胚龄越大成功率越高。有报道指出玉米幼胚胚龄越小可能对基因转化越有利。同时, 离体培养幼胚的成功率很大程度上取决于培养基的组成。对不同胚龄的诱导性愈伤组织进行比较, 并且针对两种不同的培养基(MS 与 N_6)考察它们在愈伤不同发育时期的培养结果。本实验以玉米幼胚为转化受体, 优化转化条件, 改进转化技术, 提高农杆菌介导转化频率, 并在此基础上, 将 *CpTI* 和 *Bar* 基因导入香白糯玉米自交系中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

以香白糯玉米为供试品系, 在上午 10:00 ~ 11:00 时授粉后用纸袋套好雌蕊, 分别于授粉后第 12、15、18、21、25 天摘取幼穗放置冰箱备用。

1.1.2 农杆菌菌株及质粒

菌株为根癌农杆菌 GV3850, 由美国 Miami University 李庆顺博士惠赠。该菌株内含质粒 pcB302-3。质粒的 T-DNA 区含有抗虫基因豇豆蛋白酶抑制基因(*CpTI*)和耐除草剂基因(*Bar*)(图 1)。取 30 μ L 菌液, 接种于 30 mL 加有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 条件下 250 r/min 振荡培养。

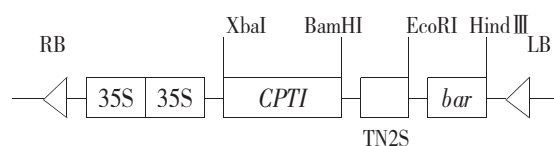


图 1 植物表达载体 PBC302-3 简图

Fig.1 Map of expression vector (PBC302-3)

收稿日期: 2007-01-17; 修回日期: 2007-03-28

基金项目: 仲恺农学院项目(G3061322)

作者简介: 梁雪莲(1969-), 女, 山西文水人, 副研究员, 博士, 主要从事农作物转基因工作。Tel: 13424101002

E-mail: liangxuelian2005@sina.com

1.1.3 培养基

MS: MS 有机 + MS 大量 + MS 微量 + 铁盐(MS 培养基成分与以下 N_6 培养基相同)

N_6 : N_6 有机 + N_6 大量 + N_6 微量 + 铁盐

诱导培养基(pH=5.8): N_6 +Gln(500 mg/L)+CH(300 mg/L)+AgNO₃(10 mg/L)+ 甘露醇(20 g/L)+ 蔗糖(20 g/L)+0.7%琼脂 +2,4-D(2 mg/L)

感染培养基(pH=5.2): N_6 + 肌醇(100 mg/L)+proline(300 mg/L)+2,4-D(2 mg/L)+3%葡萄糖 +6%蔗糖 +400 μ L/LAS(50 mg/L)

共培养培养基(pH=5.8): N_6 + 肌醇(100 mg/L)+proline(300 mg/L)+2,4-D(2 mg/L)+1%葡萄糖 +2%蔗糖 +400 μ L/LAS(50 mg/L)+0.5% ~ 0.6%琼脂

杀菌筛选培养基 (pH=5.8): N_6 + 肌醇 (100 mg/L)+proline(300 mg/L)+2,4-D(2 mg/L)+3%蔗糖 +PPT(2 ~ 4 mg/L)+0.5% ~ 0.6%琼脂

分化培养基(pH=5.8): N_6 + 肌醇(100 mg/L)+proline(300 mg/L)+3%蔗糖 +PPT(2 mg/L)+ 0.6%琼脂

生根培养基(pH=5.8):1/2 N_6 (只有大量和微量元素, 除去有机元素成分)+IBA (1.0 mg/L) +2%蔗糖 +PPT(2 mg/L)+ 1%琼脂

1.2 方法

1.2.1 再生体系的构建

(1)诱导培养:将授粉后第 12、15、18、21、25 天的玉米穗剥掉外苞叶,在超净工作台上用 70%的酒精浸泡 5 min 灭菌,然后用 0.1% HgCl 浸泡 15 ~ 20 min 消毒,同时把镊子、刀子等工具也浸泡消毒。用无菌水冲洗玉米穗 3 次,削去玉米果穗的部分胚乳,用镊子将幼胚挑出,放入预先准备好的诱导培养基里(每个培养皿大约放 30 个左右),然后放到 25℃的暗箱进行暗培养。

(2)分化培养:大约 1 个月后将愈伤组织转入分化培养基,在 25℃光照下进行分化培养。

(3)生根培养:大约 3 周左右,将分化出叶、根的愈伤组织转入生根培养基,在光照下进行生根培养。

(4)炼苗:1 个月左右后,将培养瓶的盖子打开,加上适量的水分,在光照下进行培养。1 周后将幼苗移至蛭石中进行育苗。

1.2.2 农杆菌的转化筛选

(1)根癌农杆菌的培养:取 30 μ L 菌液,接种于 30 mL 加有 50 μ L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,27℃条件下 250 r/min 振荡培养。

(2)介导材料的培养:取授粉后第 12、15、18、21、25 天的玉米幼胚诱导愈伤培养 1 ~ 3 周备用。

(3)根癌农杆菌的感染:在超净工作台上,将灭菌过的培养皿加入约 20 mL 的感染培养基,再加入 20 μ L 的农杆菌菌液,摇匀,然后分别接入预备好的

5 种胚龄的愈伤组织,分别浸泡 5、10、15 min 进行感染对照。

(4)共培养:将感染后的愈伤组织放在无菌滤纸上晾干,然后分别接入共培养基中,25℃进行暗培养。

(5)杀菌筛选培养:共培养 3 d 后,将共培养的愈伤组织分别放入加有羧苄青霉素的无菌水中漂洗,洗去其表面的农杆菌,然后在无菌滤纸上晾干。待晾干后分别放入杀菌筛选培养基,25℃进行暗培养。期间做好观察、记录,根据愈伤组织产生的脓状物决定更换新的杀菌筛选培养基。

(6)分化培养:待愈伤组织没有再产生脓状物或产生很少的脓状物后,将不同胚龄的愈伤组织转入分化培养基,在光照下进行分化培养。

(7)生根培养与(8)炼苗与再生体系相同。

1.2.3 转化植株的分子检测

(1)DNA 提取:DNA 提取采用改良 SDS 碱裂解法。

(2)PCR 检测:PCR 扩增体系为 25 μ L,扩增程序为:94℃预变性 45 s;58℃退火 45s;72℃延伸 1 min 45 s;30 个循环;72℃延伸 10 min。根据质粒中 *bar* 基因序列设计引物如下(其扩增片段为 438bp):

上游:5'-ACCATCGTCAACCACTACAT-3',

下游:5'-AGTCCAGCTGCCAGAAACCC-3',引物由生物工程公司合成。

(3)Southern-blotting:Southern 杂交取 20 μ g 纯化后的 DNA 进行,用 PCR 地高辛探针试剂盒标记质粒中的 *bar* 作为探针,用随机引物法标记分子标记,用 CSPD 法显影。

2 结果与分析

2.1 糯玉米幼胚再生体系的优化

2.1.1 不同胚龄对再生体系的影响

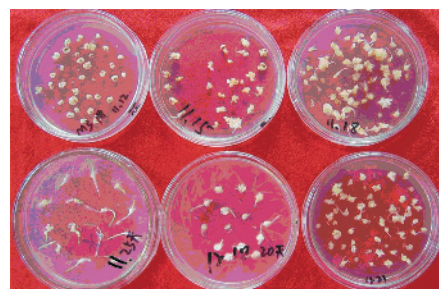


图 2 不同胚龄的玉米胚性愈伤组织之间的比较 (接种后 23 d)

Fig.2 Comparison of callus derived from different aged embryos

诱导愈伤情况对照结果见图 2。结果表明, 15~21 胚龄的玉米幼胚能更多地诱导出胚性愈伤组织, 而且愈伤组织也比较疏松。胚龄在 15~21 d 的香白糯玉米幼胚相对来说比较合适作玉米胚性植株再生体系。

2.1.2 MS 与 N₆ 对再生体系的影响

一般对诱导产生胚性愈伤组织来说, MS 比 N₆ 好, 但对幼胚直接诱导再生植株则相反。MS 与 N₆ 的主要区别在于氮源的形式不同, NO₃⁻ 与 NH₄⁺ 的比值在 MS 中为 1.9, N₆ 中为 4.0。在体细胞胚发生和植株再生时, 氮源起重要的调节作用。但在诱导产生胚性愈伤组织中, MS 的特别优势在本实验却不明显, 因为在叶分化阶段, 在 MS 培养基中的愈伤组织对于叶的分化比在 N₆ 中的愈伤组织好, 但 N₆ 培养基对于根的分化比 MS 培养基好(图 3、图 4)。而在成苗阶段中, MS 与 N₆ 的区别不明显(图 5)。

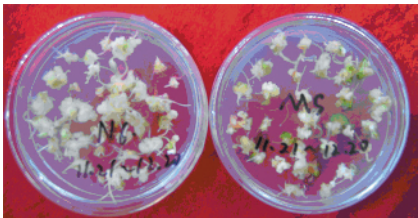


图 3 玉米愈伤组织在 MS 与 N₆ 培养基中分化叶的比较
Fig.3 Comparison of differentiated shoots (1) and roots (2) from MS and N₆ medium

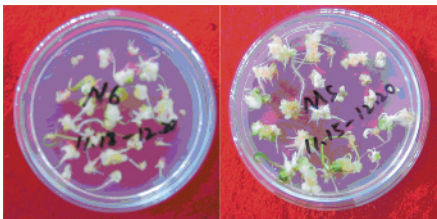


图 4 玉米愈伤组织在 MS 与 N₆ 培养基中分化根的比较
Fig.4 Comparison of differentiated shoots (1) and roots (2) from MS and N₆ medium



图 5 MS 与 N₆ 培养基中的分化玉米愈伤组织在成苗期间的比较
Fig.5 Comparison of regenerated mature plants from MS and N₆ medium

2.2 农杆菌的感染

用根癌农杆菌感染愈伤组织时应将培养瓶放于 25℃ 暗环境, 每天观察感染的情况, 根据农杆菌的繁殖速度及其产生的脓状物来决定更换培养基。一般来说, 刚感染时应坚持勤换培养基做好继代工作, 移植到生根培养基后应注意尽量少更换培养基。因为, 生根培养基含琼脂的比例比其他的培养基高, 每次更换时都会对幼苗的根造成损伤, 从而会影响幼苗的生长。另一方面根癌农杆菌感染的时间也是关键, 感染时间太短则效果不好, 太长则会造成幼胚的死亡。本实验开始时没做好继代工作, 后来又多次更换生根培养基, 所以造成很多转化幼苗伤害, 获得农杆菌感染的玉米幼苗的数量很少(图 6、图 7)。



图 6 根癌农杆菌感染后的玉米再生幼苗
Fig.6 Gene transformed plants growing in medium

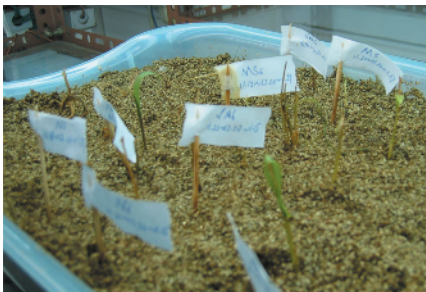


图 7 移栽到蛭石的玉米再生幼苗
Fig.7 Transplantation of gene transformed plants

2.3 转基因分子检测

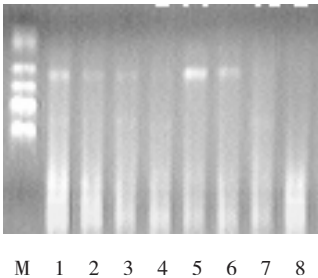


图 8 转化再生苗目的基因 PCR 结果
Fig.8 PCR of bar gene of transformed plant

将 8 株转化再生苗用 SDS 法提取 DNA 并做

PCR,结果(图 8)显示,其中 5 株为阳性;Southern 杂交结果(图 9)进一步证明这 5 株为阳性。

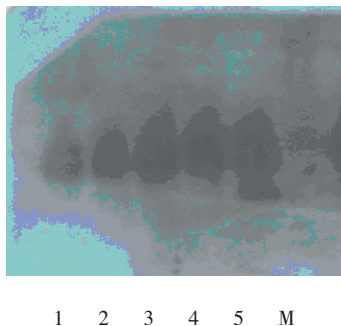


图 9 转化再生苗 PCR-Southern blotting 结果

Fig.9 PCR-Southern blotting of transformed plant

3 结 论

(1)胚龄在玉米幼胚基因转化中作用很重要。基因转化成功必须先要有好的胚性愈伤,但胚龄越小的幼胚,在人为操作方面难以实现将幼胚取出,有时取出的幼胚往往带有胚乳,造成胚性愈伤的不纯;胚龄越大的幼胚则往往会没有经过脱分化诱导出愈伤组织而直接分化成幼苗。

(2)MS 与 N_6 培养基在玉米幼胚植株再生体系的不同阶段中,其作用效果有着一定的区别。两种培养基对不同品种和品系玉米的愈伤组织的植株再生影响不同,一般对诱导产生胚性愈伤组织来说,MS 比 N_6 好。本实验发现在诱导愈伤阶段,MS 与 N_6 的区别不明显;在分化培养阶段,MS 培养基对玉米幼胚

的叶的分化有良好的效果,其分化出来的叶较多、较密,比 N_6 分化出来的叶子绿; N_6 在对根的分化培养阶段中则效果良好,其分化出的根较为粗壮和浓密;在成苗阶段,MS 与 N_6 的区别不很明显。

(3)根癌农杆菌感染时间为 5 min 时效果最佳。感染时间太短则效果不好,太长则会因农杆菌过度繁殖造成胚胎的死亡。

(4)18~21 d 胚龄的香白糯玉米幼胚最有利于根癌农杆菌的转化。18~21 d 胚龄的幼胚最有利于诱导胚性愈伤组织,有利于建立良好的香白糯玉米幼胚植株再生体系。

参考文献:

- [1] 张艳贞,王 罡,季 静.农杆菌介导的玉米遗传转化研究进展、问题与分析[J].东北农业大学学报,2003,34(1):109-113.
- [2] 刘丽霞,李德全.农杆菌介导玉米遗传转化体系的研究进展[J].生物技术通报,2005(6):25-29.
- [3] 柯遐义,张秀文,石和平,等.以玉米幼胚为受体的外源基因转化研究[J].广东农业科学,1995(2):14-16.
- [4] 农友业,何勇强,吴子恺.玉米幼胚愈伤组织的诱导及分化的研究[J].广西农业生物科学,2004,23(4):282-285.
- [5] 黄 璐,卫志明.玉米的遗传转化[J].植物生理学通讯,1997,33(3):226-232.
- [6] 袁 鹰,李启云,郝文媛,等.农杆菌介导玉米遗传转化影响因子的研究[J].分子植物育种,2006,4(2):228-232.
- [7] 傅荣昭,孙勇如,贾士荣.植物遗传转化检测技术[M].北京:中国科学技术出版社,1994.

(责任编辑:朴红梅)