



刘悦,王立达,兰英,等.玉米幼胚抗草甘膦基因的遗传转化研究[J].黑龙江农业科学,2021(8):38-41,47.

# 玉米幼胚抗草甘膦基因的遗传转化研究

刘悦,王立达,兰英,李青超,赵秀梅,杨莹,周传余

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**为培育优质高产的玉米植株,本研究利用农杆菌介导法,对 Hi-II 玉米幼胚抗草甘膦基因的遗传转化进行研究,将抗草甘膦基因 *Epsps* 转入 Hi-II 玉米幼胚,通过大量幼胚转化、共培养及其分化筛选,获得具有抗草甘膦抗性的玉米植株。计算转化率,研究外源基因在后代的遗传表达及抗性情况,并分析在农杆菌介导玉米幼胚的遗传转化中影响转化效率的主要因素。结果表明:玉米幼胚大小在 1.5~1.8 mm 时侵染效果最好,并成功获得了 9 株具有草甘膦抗性的阳性转化植株,经田间初测所获得的转基因植株具有草甘膦抗性。

**关键词:**农杆菌介导;Hi-II 玉米;抗草甘膦基因;转化

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



玉米(*Zea mays*)为一年生禾本科草本植物,是我国重要的粮食作物和饲料来源之一<sup>[1]</sup>。而杂草是影响玉米产量的最主要因素,杂草会使玉米植株的新陈代谢受到抑制,纤维素、碳水化合物、蛋白质和脂肪等物质积累减少,导致玉米的品质及产量急剧下降<sup>[2]</sup>。目前,大多使用除草剂进行化学除草,虽然可在一定程度上控制杂草的危害,但对玉米的生长发育以及粮食作物的安全性都造成了巨大危害。常规的玉米育种方法已难以满足并解决育种过程中存在的这类问题。近年来,随着分子生物学的不断发展,在玉米育种中可利用转基因技术使玉米的遗传性状得到改良<sup>[3]</sup>。因此,利用基因工程技术培育抗草甘膦的转基因玉米是目前解决杂草危害问题的一种高效率、低成本的有效途径。

抗草甘膦基因(glyphosate-resistant gene),是存在于自然界某些细菌、真菌及植物中的拮抗除草剂草甘膦的基因,其编码抗草甘膦酶 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶,通过该酶的作用可阻断草甘膦对生物合成途径的干扰,利用基因工程手段,将抗草甘膦的 *Epsps* 基因转入玉米幼胚内,培育出抗草甘膦玉米植株,成功表达的玉米植株具有对农药草甘膦的天然抗性,对于控制杂草、提高作物产量以及提高生产效率等方面有着重要意义<sup>[4-7]</sup>。本研究利用农杆菌介导法,对 Hi-

II 玉米中抗草甘膦基因的遗传转化进行研究,为培育高产优质的转基因玉米提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 玉米材料 选取授粉后 7~16 d 的优良再生系玉米 Hi-II (主要取决于幼胚大小,通常选取的时间集中在授粉后 9~12 d)。

1.1.2 供试菌株 供试菌株为含有抗草甘膦基因的 EHA105 菌株,由黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院提供。

1.1.3 试剂及培养基 培养基共 9 种,分别为 YEP 培养基、Inf 培养基、A 培养基、H 培养基、NS1 培养基、NS2 培养基、F 培养基、GF 培养基、R 培养基。培养基配方(详见附表,扫描正文前的 OSID 码)中所用试剂及草甘膦药剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 农杆菌的活化与继代 -80℃ 冰箱取出甘油菌,吸取 50~100 μL 菌液滴于培养基上,放置在 19℃ 培养箱暗培养 1~3 d,用无菌涂布棒蘸取上步骤培养好的菌,均匀地涂布于新培养基上,放置在 19℃ 培养箱培养 1~3 d,每天重复此步骤,直到该菌转化完成<sup>[8]</sup>。

1.2.2 幼穗的消毒 快速去净玉米幼穗的苞叶花丝,用 75% 的酒精冲洗 1 次,加入 7% 的次氯酸钠灭菌,滴吐温 20(1 滴·L<sup>-1</sup>),盖好桶盖放置于转速 120~135 r·min<sup>-1</sup> 的摇床上,20 min 后取下,每次至少用 2 L 灭菌水清洗,清洗 2 次。

1.2.3 悬浮液和侵染液的制备 将垂悬液中加

收稿日期:2020-12-31

基金项目:黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK2019CX14)。

第一作者:刘悦(1995-),女,硕士,研究实习员,从事植物保护研究。E-mail:2563522180@qq.com。

入 AS 和 N6,分装在 2 mL 离心管中。再取一个三角瓶配制菌液,菌液=悬浮液+菌,反复吸打混匀,将 EHA105 的菌液浓度调至  $OD_{550}=0.35$ ,即为侵染液。

1.2.4 剥取幼胚侵染与共培养 分离幼胚并挑选完整的幼胚放入悬浮液中,每管 100~110 个,浸泡于悬浮液的幼胚在 2 h 内完成侵染。

用垂悬液漂洗幼胚直至悬浮液澄清,加入侵染液,轻柔反复颠倒 20 次,暗处侵染 5 min 后,倒侵染液于滤纸上充分吸干菌液,完整幼胚转移至共培养基 A 上,鼓面朝上,平面朝下,间距均匀摆放,1 管 1 皿,于 20 ℃ 培养箱,暗培养 3 d。

1.2.5 恢复培养 将在 A 培养基中共培养 3 d 后的非乳白瘫软的完整幼胚转移至恢复培养基 H 上,鼓面朝上,平面朝下,间距均匀,每皿摆放 80~100 个,于 25~28 ℃ 培养箱,暗培养 7 d。

1.2.6 筛选培养 半筛培养:将在 H 培养基中恢复培养的所有幼胚用镊子掐去芽后转移至半筛培养基 NS1 上,鼓面朝上,平面朝下,间距均匀,每皿摆放 50 个,于 28 ℃ 培养箱暗培养 10~14 d。

筛选培养:将培养基 NS1 中的全部培养物转移至筛选培养基 NS2 上,幼胚平面朝下,间距均匀,每皿摆放 30 个,放置于 28 ℃ 培养箱,暗培养 10~14 d,一般这轮培养即可开始长出抗性愈伤组织,本轮循环往复,直到长出抗性愈伤组织。

将大于黄豆粒大小的抗性愈伤组织与其余组织分离开,抗性愈伤组织继续筛选培养,培养 10~14 d,如此循环往复,当其直径达到 2~4 cm 时进入暗分化培养,抗性愈伤组织较大而该轮不进入暗分化时,可将其分解成直径为 1 cm 的组织块继续筛选培养<sup>[9]</sup>。

1.2.7 分化 暗分化:将抗性愈伤组织均匀分布于暗分化培养基 F 上,置于 25 ℃,暗培养 10~21 d,直到大部分“小白”产生。

光分化:将“小白”挑入光分化培养基 GF 中培养,置于 25 ℃ 培养箱,强光照培养至半数以上再生苗顶盖时进入壮苗生根<sup>[10]</sup>。

1.2.8 壮苗生根 挑选生长正常强壮的再生苗,将其转移至壮苗生根培养基 R,置于 25 ℃ 培养箱,强光照培养至分化出 3~4 条根系,即可移栽至温室<sup>[11]</sup>。

1.2.9 转基因再生苗的 PCR 检测 用 CTAB 法提取幼苗 DNA,所用引物 EPA-F: CGCG-GCAAATCCTCTCTTTC; EPA-R: GACTTCAG

GGTTCGACACG,PCR 反应体系为:98 ℃ 预变性 5 min,98 ℃ 变性 45 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,72 ℃ 延伸 5 min。

2 结果与分析

2.1 幼胚大小对侵染成活率的影响

抗草甘膦基因的诱导活化和 T-DNA 的转移整合与受体的生理状态密切相关,不同大小的幼胚进行农杆菌侵染后,愈伤组织诱导数及愈伤筛选存活数存在很大差异。根据幼胚侵染结果分析表明,当幼胚大小为 1.5 mm 以下时,共培养后幼胚的存活率仅为 37%。而当幼胚大小在 1.5~1.8 mm 时,侵染效果最好且侵染后的存活率最高,共培养后幼胚的存活率可高达 83.3%。但当幼胚大小大于 1.8 mm 时,农杆菌侵染幼胚的成活率显著下降,幼胚侵染存活率为 56.7%(表 1)。综上,农杆菌侵染幼胚的成活率与其自身的大小密切相关,故在挑选幼胚时应选取大小 1.5~1.8 mm 的幼胚进行侵染,以保证侵染成功且幼胚不死亡,从而使得后续试验能有效进行。

表 1 幼胚大小对侵染成活率的影响

幼胚大小/mm	平均总侵染数	平均成功侵染胚数	平均侵染成活率/%
<1.5	2300	850	37.0 a
1.5~1.8	2590	2160	83.3 c
>1.8	2250	1275	56.7 b

注:成活率数据后的小写字母表示差异显著性( $P<0.05$ )。

2.2 幼胚各阶段生长情况

用垂悬液漂洗几次幼胚,直到悬浮液澄清,用移液枪吸走垂悬液弃于废液缸,加入侵染液,轻柔反复颠倒 20 次,置于暗处侵染。结果表明,侵染的最适时间为 5 min,时间过短会使农杆菌并未成功侵入幼胚;时间过长则会使幼胚死亡,因此,侵染时要进行严格定时,准确掌握侵染时间。

将侵染后的完整幼胚转移至共培养基 A 上进行共培养,每皿 100~110 个。结果表明,侵染后共培养的幼胚在培养基中生长,幼胚变大,且部分组织破损的幼胚死亡,表明只有完整无损的幼胚才能成功被侵染且培养长大(图 1A)。

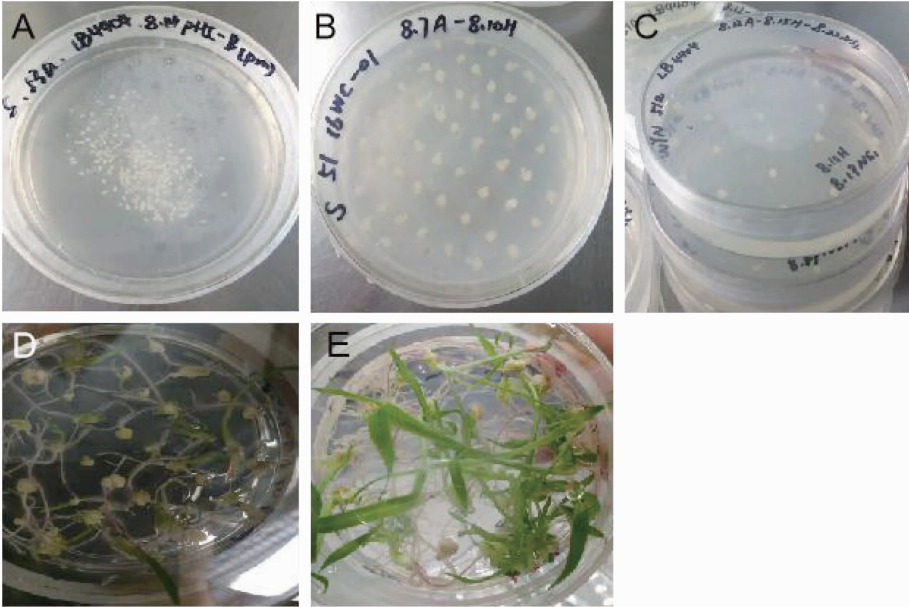
将在 A 培养基中共培养 3 d 后的非乳白瘫软的完整幼胚转移至恢复培养基 H 上,每皿摆放 80~100 个。结果表明,恢复培养后的幼胚生长速度变快,幼胚变大,鼓面更鼓甚至出现弯曲,幼胚生长状况良好,死亡现象明显减少(图 1B)。

将在 H 培养基中恢复培养的所有幼胚用镊子掐去芽后转移至半筛培养基 NS1 上,鼓面朝上,平面朝下,间距均匀,每皿摆放 50 个。结果表明,筛选培养时部分幼胚有出芽现象,转移时进行掐芽有助于愈伤组织的形成(图 1C)。

将抗性愈伤组织松散的间距均匀地分布于暗分化培养基 F 上,每皿不要摆放太多太密,用医用胶布封皿。结果表明,分化培养后抗性愈伤生长成再生苗,培养初期再生苗较小,待半数以上出

现再生苗时,再生苗长至顶盖,此时则可挑选长势好的再生苗进行壮苗生根(图 1D)。

挑选生长正常强壮的再生苗进行修剪,根部的根和愈伤组织要求全部切除干净,但不能伤到再生苗的根和茎,然后将其转移至壮苗生根培养基 R,生根罐内放同一转化事件的 3~5 棵再生苗。结果表明,每个再生苗在 R 培养基上长势良好,培养基底端可观察到生根现象,且叶变大变宽(图 1E),待根系生长健壮后移栽至室外。

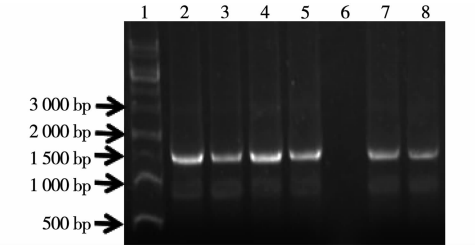


A.共培养; B.恢复培养; C.筛选培养; D.分化培养; E.分化培养的再生苗。

图 1 幼胚各阶段生长情况

2.3 转基因再生苗 PCR 检测

对在室外移栽成活的再生苗进行 PCR 检测,电泳结果表明,有 9 株再生苗扩增出的特异性条带与阳性对照一致(图 2),表明抗草甘膦基因 *Epsps* 已成功转入 Hi-Ⅱ 玉米幼胚。并在田间用草甘膦药剂检测,发现转基因植株与对照相比受药害症状减轻,初步检测结果表明所获得的转基因植株具有一定的草甘膦抗性。



1.1 kb Marker;2. CK+质粒载体;3~5、7、8. 转基因再生苗;6. CK-非转基因玉米。

图 2 部分转基因再生苗的 PCR 检测结果

3 讨论

农杆菌是一种天然的植物病原菌,被广泛运用于植物的遗传转化研究中,并且得到了非常有效的转化结果<sup>[12]</sup>。目前,应用于玉米遗传转化的方法有许多种,但大多数方法均是通过对受体材料进行机械损伤来使外源基因整合到受体材料中,但机械损伤容易产生嵌合体,所要得到的后代目的性状表达率不高,极易沉默或者丢失<sup>[13]</sup>。而农杆菌介导的玉米遗传则是通过自然途径来进行转化,没有对受体材料进行损伤,同时不易发生变异情况,成本较低且具有较高的转化率,并能获得单拷贝或低拷贝的转基因后代,因此,农杆菌介导法近年来被广泛运用于玉米的遗传转化,是一种极为有效的遗传转化方法<sup>[14]</sup>。Hi-Ⅱ 是目前转基因玉米应用得比较多的一个玉米杂交材料,它能够很快获得Ⅱ型胚性愈伤组织,平均转化率可达 40%,愈伤组织诱导率高且在整个培育过程中很

少死亡,但只有具有抗性的愈伤组织才能形成胚性愈伤,进而转入再生培养阶段<sup>[15]</sup>。因此,Hi-II 现在已经作为一种典型的转化受体材料广泛运用<sup>[16]</sup>。本试验中以 Hi-II 作为受体材料,得到了 9 株具有草甘膦抗性的阳性转化植株。

在农杆菌介导的遗传转化中,农杆菌的接种浓度、共培养的持续时间等条件是影响遗传转化效率的关键因素。有研究表明农杆菌介导玉米遗传转化的最佳共培养持续时间为 3 d<sup>[17]</sup>。本研究侵染结束于共培养基中培养 3 d 后的幼胚,可观察到幼胚长大,鼓面更鼓,有些幼胚出现泛白或瘫软现象,分析其原因可能是试验过程中对胚造成伤害导致幼胚在侵染过程中出现死亡现象。共培养结束转移至恢复培养基时筛选掉死亡幼胚,恢复培养 7 d 后,幼胚在之前的基础上继续生长,此时幼胚死亡现象已明显减少,并经过几轮反复筛选培养后出现可用于后续试验的愈伤组织。Taak<sup>[18]</sup>也通过优化农杆菌介导的遗传转化体系,得到了更稳定的转基因植物。另外,植物幼胚的大小也是影响转化效率的重要因素<sup>[19]</sup>。本研究玉米幼胚大小在 1.5~1.8 mm 时,侵染后的存活率最高。当幼胚大小为 1.5 mm 以下时,幼胚可能由于过小而在剥取和侵染过程中容易造成机械损伤,幼胚本身结构被破坏,因此共培养后存活率较低;当幼胚大小大于 1.8 mm 时,幼胚过大可能使脱分化时间较长导致愈伤诱导率不高,其生理状态不处于最佳感受态,不易被农杆菌侵染从而导致抗性筛选率下降。这与韩平安等<sup>[20]</sup>研究结果类似,玉米幼胚大小在 1.5~2.0 mm 时遗传转化效率最高。为了进一步探究玉米更高效的遗传转化体系,后续试验将对不同基因型的玉米材料进行遗传转化研究。

## 4 结论

本研究以 Hi-II 玉米作为受体材料,通过分析在农杆菌介导玉米幼胚的遗传转化中影响转化效率的主要因素,发现幼胚大小在 1.5~1.8 mm 时侵染效果最好,并将抗草甘膦基因导入了良性再生体系 Hi-II 玉米的幼胚组织中,成功获得了 9 株具有草甘膦抗性的阳性转化植株,为研究转基因玉米的优质培育奠定基础。

## 参考文献:

[1] JIN X, LI Z, FENG H, et al. Estimation of maize yield by assimilating biomass and canopy cover derived from hyperspectral data into the AquaCrop model[J]. Agricultural Wa-

ter Management, 2020, 227: 63-66.

- [2] 刘鹤天, 王丽娟, 董怀玉, 等. 几种茎叶除草剂对玉米田杂草的防除效果及产量影响[J]. 辽宁农业科学, 2019(1): 26-30.
- [3] LONDOO D M M, MEYER E, SILVA K J D, et al. Root colonization and arbuscular mycorrhizal fungal community composition in a genetically modified maize, its non-modified isoline, and a landrace[J]. Mycorrhiza, 2020(4): 1-11.
- [4] WEN Z L, YANG M K, DU M H, et al. Enrichments/de-enrichments of root-associated bacteria related to plant growth and nutrition caused by the growth of an EPSPS-transgenic maize line in the field[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1335.
- [5] 孙越, 刘秀霞, 张举仁, 等. 抗亚洲玉米螟、抗草甘膦转基因玉米的培育[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(1): 52-60.
- [6] 董喜才, 杜建中, 王安乐, 等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 292-299.
- [7] 霍岩, 李金红, 付莉. 玉米幼胚农杆菌高效转化体系的构建[J]. 饲料研究, 2017(8): 43-47.
- [8] FIRSOV A, MITIOUCHKINA T, SHALOIKO L, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum with Artemisinin biosynthesis pathway genes[J]. Plants, 2020, 9(4): 537.
- [9] NISHIMURA A. *Agrobacterium* transformation in the rice genome[J]. Cereal Genomics, 2020, 2072: 207-216.
- [10] WEN L, CHEN Y, SCHNABEL E, et al. Comparison of efficiency and time to regeneration of *Agrobacterium*-mediated transformation methods in *Medicago truncatula*[J]. Plant Methods, 2019, 15(1): 20-21.
- [11] 关淑艳, 董昭旭, 李晖, 等. 生物技术在玉米育种中的应用[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(2): 127-137.
- [12] VLADIMIR O. Editorial: New developments in *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1253-1253.
- [13] 杨小艳, 翁建峰, 谢树章, 等. 转 *CryIAb-Ma* 基因抗虫玉米植株的获得及其后代分析[J]. 分子植物育种, 2015(9): 1943-1948.
- [14] 刘允军, 贾志伟, 刘艳, 等. 玉米规模化转基因技术体系构建及其应用[J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4172-4182.
- [15] 贾艾敏, 张玲, 蒋葵, 等. 农杆菌介导的 *2mG2-epsps* 基因转化玉米自交系 18-599R 幼胚的研究[J]. 四川农业大学学报, 2015, 37(6): 13-16.
- [16] 谢树章, 杨小艳, 林清, 等. 抗草甘膦转基因玉米研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 36-41.
- [17] 李韩帅, 周秒依, 杨凤玲, 等. 农杆菌介导的玉米自交系 Z21 遗传转化体系的研究[J]. 山西农业科学, 2018, 46(4): 517-521.
- [18] TAAK P, TIWARI S, KOUL B. Optimization of regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A commercially important natural sweetener plant[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 16224-16224.
- [19] 李金红, 付莉, 关晓溪, 等. 根癌农杆菌介导的玉米幼胚遗传转化体系[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(3): 266-271.
- [20] 韩平安, 吴新荣, 李晓东, 等. 利用农杆菌介导法将抗草甘膦基因转入玉米自交系 H99 的研究[J]. 北方农业学报, 2020, 48(2): 21-26.

(下转第 47 页)

力球孢白僵菌菌株对 6 种植物病原真菌的拮抗作用研 [14] 夏龙荪,林华峰. 白僵菌对几种常见植物病原菌的拮抗作用[J]. 蚕业科学,2018,44(1):25-31. 用研究[J]. 中国生物防治学报,2013,29(2): 324-330.

# Primary Study on Biological Characteristics and Antagonistic Potentiality of Five Strains of Entomogenous Fungi

LI Min,YANG Fan, LIU Chun-lai, LIU Xing-long, WANG Shuang,JIANG Xi-feng, CAO Da-wei, LI Xin-min

(Plant Protection Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science/Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Harbin,Ministry of Agriculture,Harbin 150086,China)

**Abstract:**In order to obtain entomogenous fungi with excellent traits and potential for biocontrol,this experiment carried out basic biological assays on the obtained entomogenous fungi and the antibacterial activity of 6 main species pathogens. The results showed that the optimal growth temperature of strain FNS5 and FYS3 were 25-28 ℃ and 28-30 ℃ ,respectively. The optimal sporulation temperature of strain FYS3 was wider,which was 20-30 ℃ and strain FNS5 was 20-25 ℃ . The germination rate of strain FNS5 under the 48 h microscopic examination was 68% at 25 ℃ ,which was significantly different from other treatments. Strains FNS5 and FYS3 both showed broad-spectrum and strong inhibitory effects. In the plate confrontation test,the inhibition rate of *Metarhizium anisopliae* FYS3 on *Pyricularia grisea* reached 47. 13%. The agar diffusion test showed the metabolism of *Metarhizium anisopliae* FNS5 and FYS3 had an antagonistic effect on *Botrytis cinerea* ,and the diameters of the inhibition zone were (3. 22±0. 19) cm and (3. 51±0. 29) cm,respectively. So they have further biocontrol research value.

**Keywords:**entomogenous fungi; biological characteristics; antagonism

(上接第 41 页)

# Genetic Transformation of Glyphosate-tolerant Genes in Maize Immature Embryos

LIU Yue,WANG Li-da,LAN Ying,LI Qing-chao,ZHAO Xiu-mei,YANG Ying,ZHOU Chuan-yu  
(Qiqihar Branch,Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,Qiqihar 161006,China)

**Abstract:**In this study,*Agrobacterium tumefaciens*-mediated method was used to study the genetic transformation of glyphosate-tolerant genes in Hi-II maize. Immature glyphosate gene *Epsps* was transferred into Hi-II maize immature embryos,co-culture and differentiation screening,to obtain resistance to glyphosate resistance of maize plants. The conversion rate was calculated,the genetic expression and resistance of exogenous genes in offspring were studied,and the main factors influencing the transformation efficiency were analyzed in the genetic transformation of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated immature embryos. The results showed that at the 1. 5-1. 8 mm maize embryo size,the infection effect was the best,and 9 plants with glyphosate resistance were successfully transformed,glyphosate resistance of transgenic plants obtained by inter-field testing. The results of this study can provide scientific basis for the study of high quality cultivation of transgenic maize.

**Keywords:***Agrobacterium tumefaciens* ; Hi-II maize; glyphosate-tolerant gene; transformation