

影响农杆菌介导玉米愈伤组织 遗传转化因素的研究

农友业¹, 何勇强², 覃燕¹, Rachid Loukehaich², 吴子恺¹

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 广西大学生命科学技术学院, 广西南宁 530005)

摘要: 用农杆菌介导玉米愈伤组织的转化, 其筛选的结果得到的抗性愈伤组织受玉米愈伤组织的继代时间、浸染的农杆菌菌液浓度、共培养的温度以及其共培养时间等因素的影响。玉米愈伤继代后 7~9 d, 农杆菌浓度为 OD₆₀₀ 值 0.3 左右、共培养温度约 22 °C、培养时间 3 d 时, 抗性愈伤的获得率最高。

关键词: 玉米; 愈伤组织; 农杆菌; 转化; 影响因素

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0142-03

Study of influence factors on transformation of maize embryogenic callus by *Agrobacterium tumefaciens*

NONG You-ye¹, HE Yong-qiang², QING Yan¹,
Rachid Loukehaich², WU Zi-kai¹

(1. *Agriculture College of Guangxi University, Nanning 530005, China*; 2. *Life Sciences and
Technology College of Guangxi University, Nanning 530005, China*)

Abstract: Embryogenic callus of transformation of maize was generated by *Agrobacterium tumefaciens*. The result showed that resistant callus regenerated was influenced by the length of time of callus continuing culture, concentration of infecting *A. tumefaciens*, co-culture temperature and the length of co-culture time. The percentage of resistant callus regenerated was the highest when callus continuing culture time was 8~10 d, infecting *A. tumefaciens* concentration was OD₆₀₀ = 0.3, the co-culture temperature was about 22 °C and the co-culture time was 3 d.

Key words: maize; callus; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation; influence factors

玉米(*Zea mays* L.)是一种重要的经济作物,具有多种遗传特性,其遗传转化的研究一直受到重视。到目前为止,已建立了多种外源基因导入玉米受体细胞的遗传转化方法。其中农杆菌和基因枪在玉米遗传转化中担任着重要角色。大多数单子叶植物不是农杆菌的天然宿主(De等,1976)。因此,农杆菌介导的转化法长期未能在单子叶植物上得到应用。自从Gould等(1991)用根癌农杆菌与玉米茎尖培

养获得了转基因植株以来,农杆菌介导的禾谷类作物的转化研究取得了很大的进展。Koziel等(1993)培育出了抗虫的转基因玉米。农杆菌介导的遗传转化有可以转移相对较大的DNA片段,获得较多的单拷贝转基因植株,转化效率高等优点(李新征等,2000),目前已成为研究的热点,在近年玉米的遗传转化研究中得到广泛应用。但在农杆菌介导的玉米遗传转化过程中,各种因素影响其转化效率(杨秀荣

收稿日期: 2004-05-31 修订日期: 2004-10-18

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项项目(J00-003-03)

作者简介: 农友业(1966-),男,广西宾阳人,在读博士生,讲师,植物基因工程专业。E-mail: younong@gxu.edu.cn.

等,2002;张艳贞,2003)。本研究就农杆菌介导玉米遗传转化的几个影响因素进行探索,以寻找最佳的转化条件,提高转化率,为农杆菌介导玉米的遗传转化研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

玉米自交系农大 S₁ 由广西大学农学院提供,农杆菌 LBA4404 携带的植酸酶基因为我们从米曲霉中克隆的目的基因(在 GeneBank 的注册号为 AY603416),构建植物表达载体 pCAM-phyA 后转化到农杆菌 LBA4404 而得。基本的筛选培养基为 MS 培养基无机盐,外加葡萄糖 30 g/L,琼脂 7.5 g/L,2,4-D 1.0 mg/L,水解酪氨酸 0.2 mg/L,脯氨酸 0.5 mg/L,头孢霉素 100 mg/L,潮霉素 20 mg/L。

1.2 方法

取玉米自花授粉后 9~11 d 长约 1.5~2 cm 的玉米幼胚,于诱导培养基中培养得到 II 型愈伤组织(图版 I:1)。然后于继代培养基中继代,以此愈伤组织作材料用于侵染。侵染后的愈伤组织都用基本的筛选培养基筛选 3 次,每次 15 d,最后得到抗性的愈伤组织(图版 I:2)。

1.2.1 受体材料的影响 分别取继代后 5、7、9、11、14 d 的愈伤组织为受体材料用于侵染,22 °C 共培养 3 d 后筛选。

1.2.2 农杆菌浓度的影响 分别以 OD₆₀₀ 值为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 的农杆菌菌液浓度侵染愈伤组织,22 °C 共培养 3 d 后筛选。

1.2.3 共培养温度的影响 以 OD₆₀₀ 值为 0.3 的农杆菌菌液侵染后,分别在 20、22、23、26、28 °C 条件下共培养 3 d,然后筛选。

1.2.4 共培养时间的影响 以 OD₆₀₀ 值为 0.3 的农杆菌菌液侵染后,分别于 22 °C 共培养 2、3、4、5 d,观察其共培养时间对转化的影响。通过上述不同的培养条件,以抗性愈伤组织的获得率来确定最佳介导的外界条件。

2 结果分析

2.1 受体材料的影响

用继代后不同时期的愈伤组织进行培养,其抗性愈伤的获得率不同(表 1)。以继代后 7~9 d 的愈

伤组织侵染,其抗性愈伤的获得率最高,为 23.0%~25.3%。继代时,将愈伤组织切成大小约 0.4 cm 的小块进行继代。继代后,愈伤组织重新恢复生长。经百分率差异显著性测验结果表明,继代后第 7 天浸染与继代后第 5 天,第 11 天,第 14 天获得的抗性愈伤组织数有极显著差异。侵染继代后 5 d 的愈伤组织相对较小,而且没有达到旺盛生长期,侵染后很容易死亡。继代后 11~14 d 的愈伤组织已过了旺盛生长期,其表面也开始变褐,逐渐老化,因此转化率较低。而继后 7~9 d 的愈伤组织大小适中,而且处于旺盛生长期,其转化率较高。

2.2 农杆菌浓度的影响

侵染时农杆菌的浓度过高,筛选时杀菌比较困难,愈伤组织由于农杆菌生长过旺也容易死亡。农杆菌浓度过低,农杆菌数量过少,转化效率也随之降低。经百分率差异显著性测验结果表明,侵染的农杆菌菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.3 时比浓度为 OD₆₀₀ = 0.1 时获得的抗性愈伤组织数有显著差异。侵染的农杆菌菌液浓度为 OD₆₀₀ 值达 0.2~0.3 为宜。尽管农杆菌浓度在 OD₆₀₀ 为 0.2~0.5 时,得到的抗性愈伤组织差异不太明显,但浓度为 OD₆₀₀ = 0.2~0.3 时,已获得最高抗性愈伤数,此时农杆菌菌液浓度为 OD₆₀₀ 值达 0.2~0.3 为宜,这样在筛选时杀菌相对比较容易,也不会由于筛选培养时农杆菌过度生长而造成愈伤组织死亡,选择菌液浓度太高或太低抗性愈伤的获得率都低(表 1)。

2.3 共培养时温度的影响

在玉米愈伤组织的诱导、继代、分化、生根的过程中,均使用其生长的最适温度 25 °C,为了确定其侵染的最适温度,设计了几个共培养温度。当共培养的温度为 22 °C 时,抗性愈伤组织的获得率最高。经百分率差异显著性测验,分析表明,共培养温度 22 °C 时抗性愈伤组织的获得数与共培养温度为 24、26、28 °C 时抗性愈伤组织的获得数呈现极显著差异(表 1)。

2.4 共培养时间的影响

共培养时间过短,农杆菌没有充分侵染愈伤组织,获得的抗性愈伤组织少;共培养时间过长,农杆菌过度繁殖,抑菌困难,农杆菌生长过旺,愈伤组织容易死亡。共培养时间为 3 d 时获得的抗性愈伤组织数与共培养时间为 1 d 时获得的抗性愈伤组织数呈极显著差异,与共培养时间为 5 d 时获得的抗性愈伤组织数差异达显著水平(表 1),共培养时间为 3 d 最佳。

表 1 受体材料、农杆菌浓度、共培养的温度及共培养时间对转化的影响
Table 1 Influence of infected different callus, density of *Agrobacterium tumefaciens*, temperature of co-culture and time of co-culture on transformation

项目 Items	侵染的愈伤 组织数(块) The number of callus(piece)	获得抗性的愈伤 组织数(块) The number of resistant callus regenerated(piece)	抗性愈伤组织 获得率(%) The percentage of resistant callus regenerated	差异显著性 Significance of difference	
愈伤组织继代后天数(天) Time after callus was continuing cultured(d)	14	305	16	5.1	20.2**
	11	307	30	9.6	15.7**
	5	303	46	15.3	10.0**
	9	312	72	23.0	2.3
	7	310	78	25.3	
农杆菌浓度(OD ₆₀₀) Density of <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	0.1	312	46	14.6	8.0*
	0.4	307	59	19.2	3.4
	0.5	301	52	21.3	1.3
	0.2	304	67	22.1	0.5
	0.3	309	70	22.6	—
共培养温度(°C) Temperature of co-culture	28	306	19	6.3	18.0**
	26	304	26	8.5	15.8**
	24	310	40	13.1	11.2**
	20	296	57	19.2	5.1
	22	308	75	24.3	
共培养时间(天) Time of co-culture(d)	1	321	40	12.5	10.6**
	5	310	39	15.7	7.4*
	4	308	59	19.2	3.9
	2	303	66	21.9	1.2
	3	316	73	23.1	—

注:百分率差异显著性测验。*:0.05水平,差异显著;**:0.01水平差异极显著。

Note: Analysis of the significant difference of the percentage *:0.05 means significant; **:0.01 means very significant.

3 小结

农杆菌介导玉米愈伤组织转化的影响因素有许多,在农杆菌介导玉米愈伤组织转化的研究过程中,我们只对影响因素的主要四个因素进行总结,并且只对一个基因型玉米进行研究,不同基因型玉米的最佳介导条件会有差异。在此得到的四个最佳介导条件在其他基因型玉米的介导中可能有所不同,在此得到的结果只为农杆菌介导玉米愈伤组织转化的研究提供参考。

参考文献:

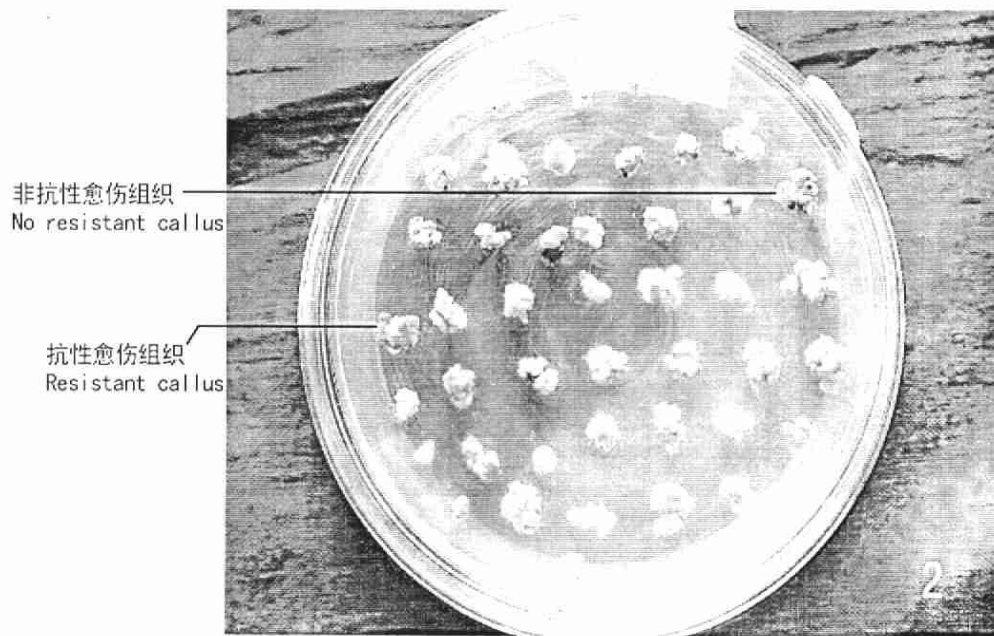
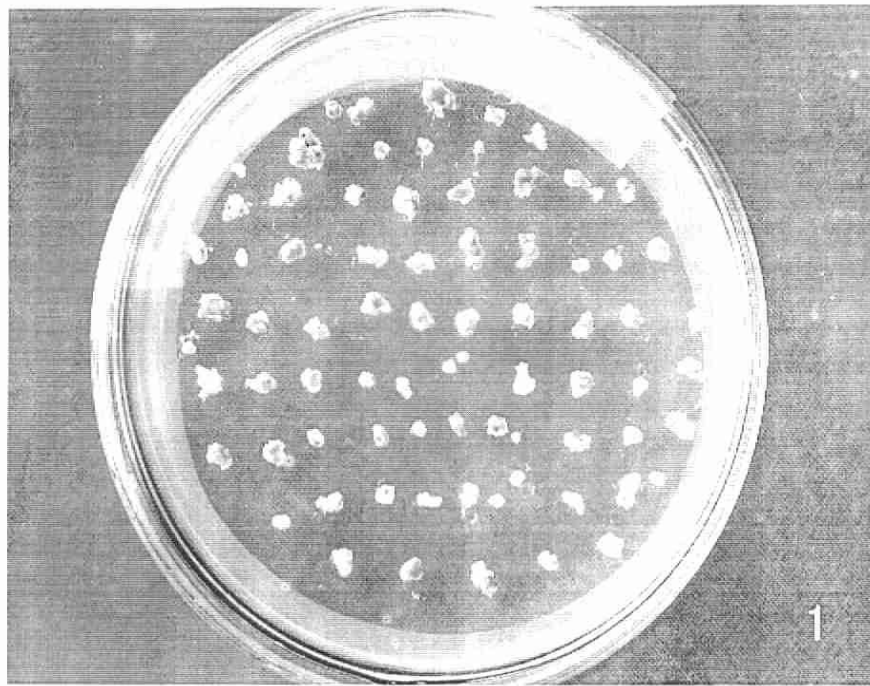
- De Cleene M, Deley J. 1976. The host range of crown gall [J]. *Bot Rev.* 42: 389-466.
Koziel MG, Beiland GL, Bowman C, et al. 1993. Field performance of elite transgenic maize plant expressing an insect-

icide protein derived from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Bio-Technol.* 11-194.

- Li XZ(李新征), Zheng CC(郑成超), Wen FJ(温孚江). 2000. A brief review on genetic transformation of maize (*Zeamays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (农杆菌介导的玉米遗传转化研究进展) [J]. *A Brief Review on Bioengineering* (生物工程进展), 20(6): 19-21.
Yang XR(杨秀荣), Chen YW(陈永文), Fang p(方平), et al. 2002. The effect of *Acetosyringone* on transformation of sweet potato by *Agrobacterium tumefaciens* (乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响) [J]. *J South-west China Normal Univ (Nat Sci)* 西南师范大学学报(自然科学版), 27(5): 753-758.
Zhang YZ(张艳贞), Wang G(王罡), Ji J(季静). 2003. Advances, problems and analysis in genetic transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens* (农杆菌介导的玉米遗传转化研究进展、问题与分析) [J]. *J North-east Agric Univ* (东北农业大学学报), 34(1): 109-113.

农友业, 等: 影响农杆菌介导玉米愈伤组织遗传转化因素的研究
NONG You-ye, *et al.*: Study of influence factors on transformation of maize
embryogenic callus by *Agrobacterium tumefaciens*

图版 I
Plate I



1. II型愈伤组织; 2. 筛选后得到的抗性愈伤组织。
1. II resistant callus; 2. Resistant callus after resistant culturing.

72