

转*TfdA*基因提高玉米抗除草剂2,4-D的能力

王碧微^{1*}, 秦利军^{1*}, 赵德刚^{1,2**}

¹贵州大学农业生物工程研究院/生命科学学院, 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳550025;

²贵州省农业科学院, 贵阳550006

摘要: 本研究以玉米(*Zea mays*)为材料, 通过农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的茎尖转化法将对除草剂2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)降解的*TfdA*基因转入玉米, 筛选出对除草剂2,4-D具有高抗性的转基因玉米植株。研究表明, 喷施20 g·L⁻¹的2,4-D溶液7 d后, 91%的野生型玉米植株出现根和茎肿胀畸形且横向生长、叶片枯黄脱落等现象, 而转基因植株生长良好, 未出现明显的受害症状。随2,4-D处理时间的推移, 转基因和非转基因玉米植株的叶绿素含量均逐渐下降, 但后者的降幅极显著高于前者。二氨基联苯胺(DAB)染色后发现, 经2,4-D处理的野生型植株叶片H₂O₂积累显著高于转基因植株, 且前者的丙二醛(MDA)含量也显著高于后者, 分别为3.34和2.08 μmol·g⁻¹(蛋白)。在2,4-D处理3 d后, 转基因植株的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性峰值分别为34.88、4.10和31.56 U·mg⁻¹(蛋白), 是其野生型的1.65、1.4和1.7倍(差异极显著)。综上所述, 转*TfdA*基因玉米显著提高了对除草剂2,4-D的抗性。

关键词: 玉米; 2,4-D; *TfdA*基因; 除草剂

玉米(*Zea mays*)是重要的饲料和粮食作物, 在国民经济中占有重要地位(Khoury等2014)。田间杂草是导致玉米产量降低的主要因素之一, 据报道, 我国有近1/2的玉米种植田受到不同程度的杂草危害, 重者可引起玉米减产30%~50% (廖华刚和韩昌志2011)。如今通过化学除草剂来控制杂草成为现代化农业不可缺少的一部分, 常用于田间除草的化学试剂主要包括酰胺类、三氮苯类、磺酰胺类、苯氧羧酸类等4类(胡景平等2013), 由于化学除草剂的施用较人工除草省时省力、见效快、效果好且劳动生产率高, 已逐渐成为玉米田杂草防除、提高玉米产量的重要措施之一(靳彩霞2010)。其中, 苯氧羧酸类化学除草剂以价格低廉、除草效率高、除草谱广且无残留等优点, 被广泛应用于麦田、稻田、玉米田等(张玉聚等2003)。2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是典型的苯氧羧酸类除草剂, 低浓度时可促进植物生长, 高浓度时发挥除草作用, 使杂草的茎部组织增加核酸和蛋白质的合成, 成熟细胞恢复分裂能力, 造成生长异常而导致杂草死亡(苏少泉等2013)。然而, 该除草剂若使用不当也会对非靶标的玉米植株产生药害, 发生在新叶及生长点, 轻则影响植株的生长, 重则导致产量损失, 甚至绝产(Grossmann 2009)。有针对性地喷施植物生长调节剂, 利用锌、铁、钼等微肥和叶面肥, 以及运用杂交育种方法可以减轻2,4-D对植物的药害(韩金伟等2011), 但利用转基因手段对玉米品种进行性状

改良培育抗除草剂玉米材料才是有效的解决途径(李余良和胡建广2006)。现已分离到降解2,4-D的基因有*TfdA*、*spdA* (Wright等2015)。本实验室前期从施用除草剂2,4-D的土壤中分离筛选出22株对2,4-D降解能力较强的贪铜菌属*Cupriavidus campinensis* BJ71菌株, 并克隆得到了2,4-D降解基因*TfdA* (Han等2015), 该基因能通过表达2,4-D降解酶使烟草(*Nicotiana tabacum*)和黑麦草(*Lolium perenne*)具有2,4-D抗性(数据未发表)。本研究利用本实验室前期研究克隆获得的来源于细菌*C. campinensis* BJ71菌株的2,4-D降解基因*TfdA* (NCBI登记号: KJ028765), 构建含有*Ubi-Gus::bar-Nos*和*Act1-TfdA-Nos*表达元件的单子叶表达载体pGM626-LF-*TfdA*对玉米进行遗传转化, 以期获得并创制对除草剂2,4-D抗性增强的玉米新种质。

材料与方法

1 实验材料

野生型玉米(*Zea mays* L.)品种为‘丰111’, 由本实验室保存。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105由山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室保存并提供。质粒

收稿 2017-03-28 修定 2017-05-02

资助 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX080-10003-009)和贵州省科技厅转基因专项(黔科合2004NG-Z004)。

* 并列第一作者。

** 通讯作者(E-mail: dgzhao@gzu.edu.cn)。

pGM626-LF-*TfdA*含有*Ubi-Gus::bar-Nos*和*Act1-TfdA-Nos*表达元件(图1),由本实验室构建。植物DNA提取试剂盒购于天根生化科技有限公司,质粒提取试剂盒购于Omega公司,*TfdA*检测引物由Invitrogen公司合成,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(proxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研

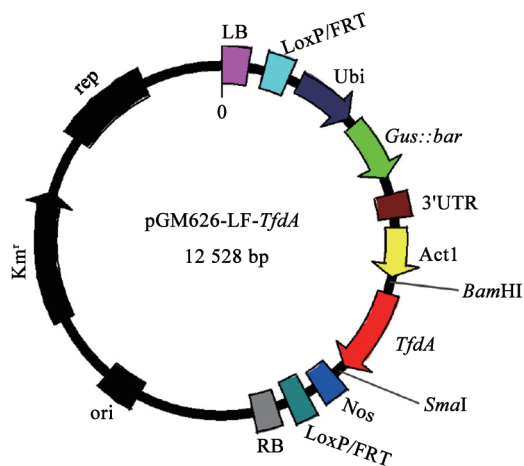


图1 pGM626-LF-*TfdA*表达载体
Fig.1 pGM626-LF-*TfdA* expression vector

究所。

2 实验方法

2.1 玉米茎尖转化方法

参考本实验室前期玉米遗传转化方法挑选子粒饱满、大小一致的玉米品种‘丰111’种子,播在装有珍珠岩的塑料盘中催苗萌发,待种子胚芽萌至1~3 cm长时,用刀片在玉米茎尖生长点处斜切,去掉胚芽鞘,暴露出茎尖生长点备用。参考农杆菌活化的过程,将含有目的表达载体pGM626-LF-*TfdA*的工程农杆菌活化培养至 OD_{600} 为1.2时备用。将暴露出茎尖的玉米植株分别浸入农杆菌重悬液中,在50.65 kPa真空渗透压下侵染10 min,结束后用滤纸吸去多余的重悬液,播于盛有营养土的花盆中,将茎尖暴露在土壤表面,置于28°C培养。

2.2 转基因玉米植株鉴定与筛选

2.2.1 转基因植株鉴定

目的表达载体pGM626-LF-*TfdA*含有*Gus*报告

基因,可通过GUS染色筛选阳性植株。待侵染种子萌发至三至五叶期时,剪取植株的幼嫩叶片细丝于GUS染液后置于真空干燥器内真空渗透10 min,放置于37°C恒温培养箱中过夜,经无水乙醇进行脱色处理后,再观察叶片颜色。

参照TIANGEN公司Plant DNA Kit说明提取GUS染色阳性的玉米植株的总基因组,利用特异性引物*TfdA*-F/*TfdA*-R进行PCR扩增,引物为*TfdA*-F: 5'-AAGTACGCCGAAGTGGCCGACATCT-3'; *TfdA*-R: 5'-TTGCGGACTCTAATCATAAAAACC-3';预期扩增产物大小为801 bp。PCR扩增体系(20 μ L): 10.0 μ L *Premix Taq* (*Ex Taq* Version 2.0 plus dye)、1.0 μ L 10 μ mol·L⁻¹特异性引物*TfdA*-F/*TfdA*-R、1.0 μ L Template DNA、7.0 μ L ddH₂O。具体扩增条件为94°C预变性3 min; 94°C 45 s; 42°C 50 s, 72°C 1 min,循环35次; 72°C延伸5 min。反应结束后,取5 μ L扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像仪检测结果。

2.2.2 转基因植株筛选

选取四叶期的转基因玉米植株,剪取植株相同叶位的叶片放于附有滤纸的白磁盘中,下端用棉花覆盖保湿。参考李翠翠等(2015)的方法,用10 g·L⁻¹的2,4-D溶液均匀涂抹于叶片表面,5 d后观察并记录叶片的情况。

2.3 转*TfdA*基因玉米的2,4-D抗性分析

选取同一生长条件下长势相同的三至五叶期的野生型玉米幼苗180株(每30株为一组),每组分别喷施5、10、15、18、20、22 g·L⁻¹ 6个不同浓度的2,4-D溶液30 mL。7 d后统计结果,以植株根、茎肿胀畸形,横向生长,叶片枯黄脱落作为判断受害标准。

$$\text{受害率} = \frac{\text{受害株数}}{\text{总株数}} \times 100\%$$

将生长条件、长势相同的三至五叶期转基因和野生型植株各30株种植于相同条件下的花盆中,以适宜浓度的2,4-D溶液30 mL进行喷施,7 d后观察并记录转基因植株和野生型植株的生长情况。所有实验均重复3次,清水对照。数据用Excel和SPSS 22.0进行处理和分析。

2.4 转*TfdA*基因玉米植株的生理生化特性分析

选取生长良好、长势一致的三至五叶期的转

基因玉米和野生型玉米植株, 每株喷施0.5 mL适宜浓度的2,4-D溶液, 测定喷施前和喷施1、3、5、7 d后叶绿素和MDA含量, 以及CAT、SOD、POD活性。叶绿素含量测定参照Arnon法; MDA含量以及SOD、CAT、POD活性测定参照试剂盒操作说明书进行; 2,4-D喷施2 d后, 对玉米植株叶片产生的 H_2O_2 进行检测, 参考Daudi和O'Brien (2012)二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)染色的方法。所有实验均重复3次, 数据分别用Excel和SPSS 22.0进行处理和分析。

实验结果

1 转基因植株的鉴定和筛选

对进行遗传转化得到的174株玉米植株进行GUS组织化学染色分析, 结果显示43株植株叶片呈现阳性(图2-A), 对阳性植株进行PCR扩增验证, 电泳结果显示, 扩增出大小约为801 bp的目的条带,

而野生型植株未能扩增出该目的条带(图2-B), 证明2,4-D降解基因*TfdA*已经成功整合到受体植物中。

经过2,4-D涂抹试验, 5 d后观察到野生型叶片大面积变黄, 而转基因叶片变黄范围小于野生型叶片。其中一部分叶片对2,4-D具有高抗性, 只有一小部分变黄(图2-C)。选取对2,4-D具有高抗性植株移栽, 常规水肥管理, 用于后述的研究。

2 转*TfdA*基因玉米的2,4-D抗性

用 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D处理转*TfdA*玉米7 d后, 植株生长正常几乎不受影响; 当浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 55.67%植株叶片呈杯状, 发育迟缓, 茎秆扭曲; $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 92%的植株叶片枯萎, 根、茎肿胀畸形, 受害严重; $22\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时植株几乎全部受害死亡。

根据SPSS分析及最小显著差数(least significant difference, LSD)法多重比较, 2,4-D浓度为 $5\sim 20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 各浓度梯度的受害率差异显著; $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时

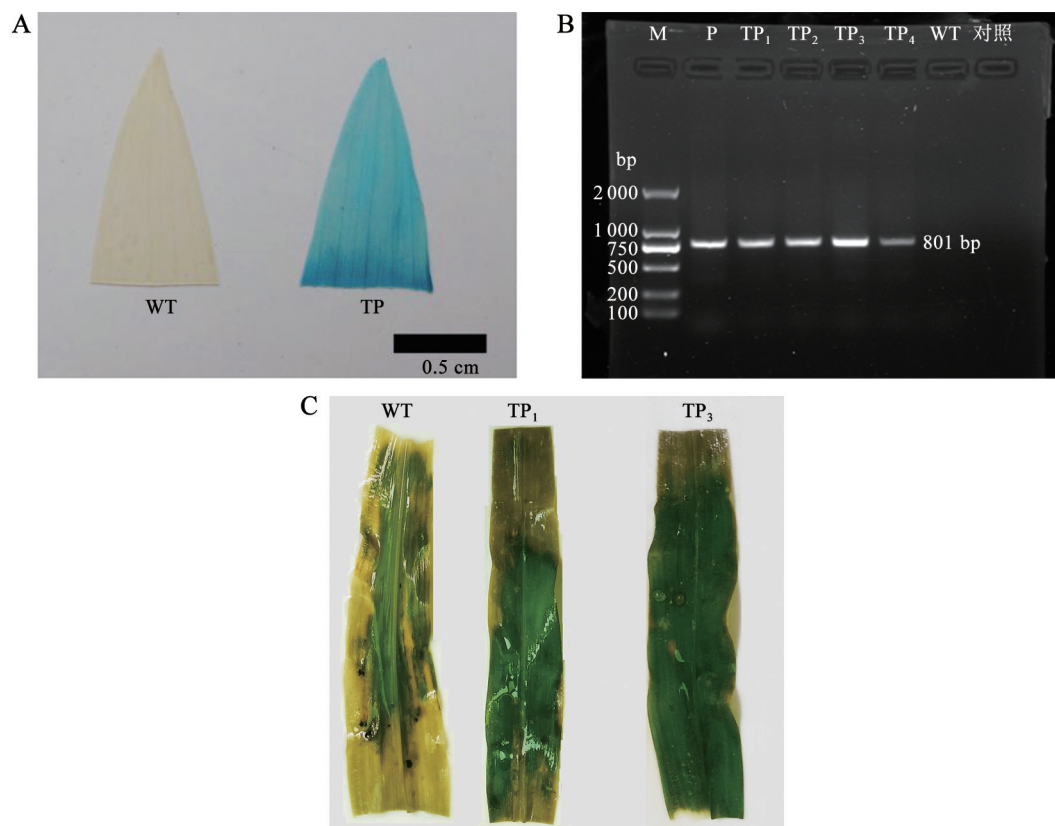


图2 转基因玉米叶片的GUS组织化学染色及PCR鉴定

Fig.2 GUS histochemical staining and PCR analysis for transgenic maize leaves

A: 玉米叶片GUS组织化学染色; B: *TfdA*基因PCR鉴定; C: 转*TfdA*基因玉米的2,4-D抗性。WT: 野生型植株; TP: 转基因株系(TP₁: 低抗转基因株系; TP₃: 高抗转基因株系); M: DL2000 marker; P: pGM626-LF-*TfdA*质粒; 对照: H_2O 。

受害率为92%，增加至22 g·L⁻¹时受害率为97.3%，两浓度间没有显著差异。综上，选择对植株有显著受害影响的2,4-D最小浓度20 g·L⁻¹作为转基因植株是否具有抗性的受害筛选浓度(表1)。

用筛选浓度20 g·L⁻¹的2,4-D溶液处理7 d后，野生型玉米植株根、茎肿胀畸形，横向生长，叶片枯黄脱落，受害率为91% (图3-A和C)，而对照的野生型玉米生长良好(图3-E)。转基因玉米小部分生长受抑制，大部分不受影响，仍生长良好，受害率比野生型植株少64% (图3-B和D)，与对照组生长差异不大(图3-F)。TfdA基因在玉米中的表达显著提高

表1 不同浓度2,4-D对玉米植株的伤害

Table 1 Damage to maize plants with different concentrations of 2,4-D

2,4-D浓度/g·L ⁻¹	受害率/%
5	16.67±3.51 ^e
10	34.00±3.46 ^d
15	55.67±5.13 ^c
18	79.67±3.51 ^b
20	92.00±1.73 ^a
22	97.33±2.31 ^a

表中数据表示为平均值±标准差, n=3; 受害率数据用不同小写字母标识表示差异显著(P<0.05)。

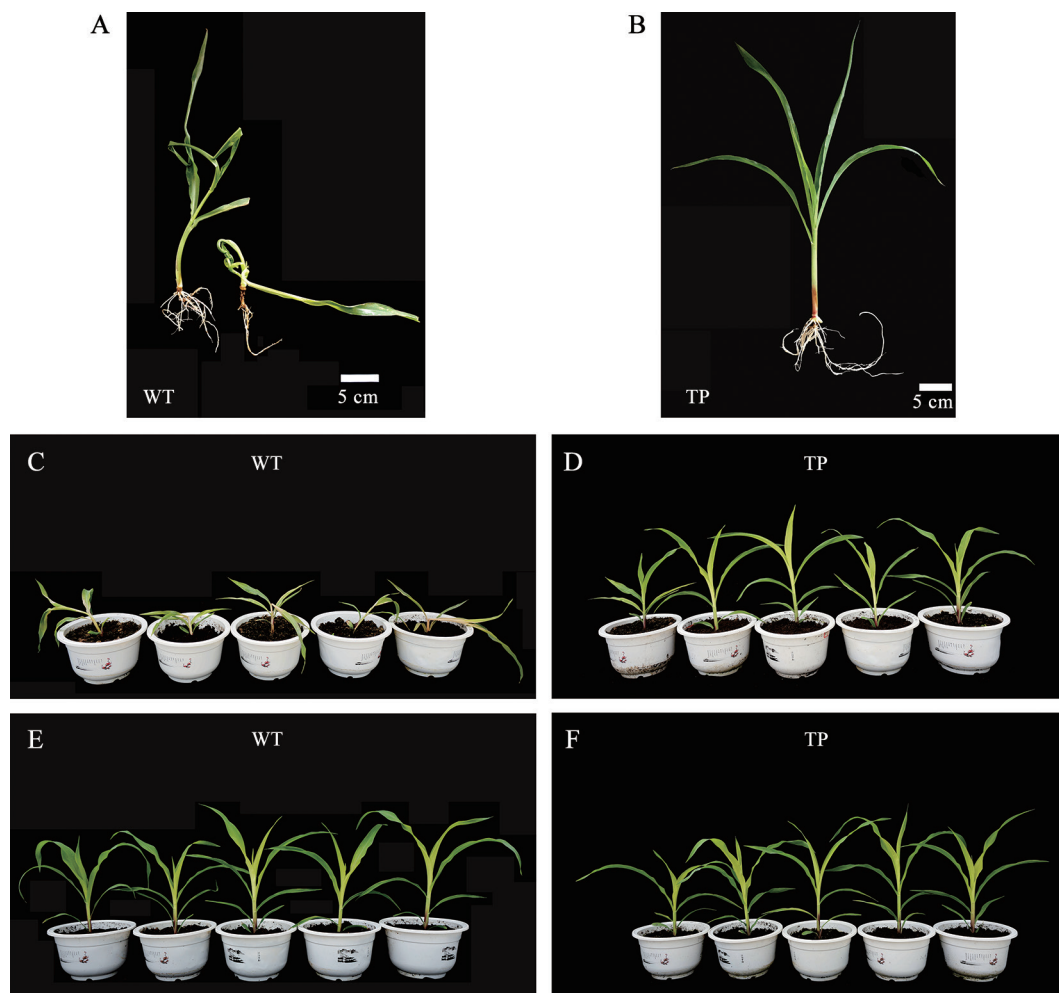


图3 转TfdA基因玉米的2,4-D抗性分析

Fig.3 Analysis of 2,4-D resistance in TfdA-contained maizes

WT: 野生型植株; TP: 转基因植株; 图4~6同比。

了转TfdA基因玉米对除草剂2,4-D的抗性。

3 转TfdA基因玉米的理化指标分析抗性

3.1 2,4-D对转基因玉米叶绿素含量的影响

叶绿素含量测定表明，在正常生长条件下(28°C)，野生型和转基因叶片叶绿素含量分别为1.790和1.751 mg·g⁻¹ (FW)，转基因植株叶片叶绿素含量比

野生型低 2.179%。随着 2,4-D 处理时间的延长, 野生型植株的叶绿素含量下降了 7.23%, 是转基因植株的 2.35 倍, 差异极显著(图 4)。

3.2 2,4-D 对转基因玉米叶片产生 H_2O_2 的影响

DAB 染色结果显示, 2,4-D 处理前, 转基因和野生型叶片都没有出现褐色沉积; 经过 2,4-D 处理后, 野生型叶片比转基因叶片出现了更多的褐色沉积, 这些褐色沉积就是 DAB 与 H_2O_2 产生处发生反应形成的, 初步检测出野生型植株中 H_2O_2 的聚集情况明显比转基因植株多(图 5-A)。

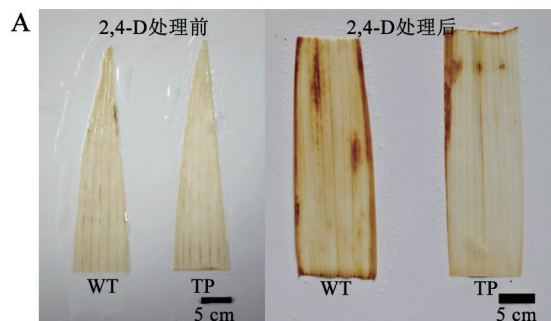


图 5 2,4-D 对转基因玉米叶片产生 H_2O_2 的影响

Fig.5 Effect of 2,4-D on accumulation of H_2O_2 in transgenic maize

在 2,4-D 处理下, MDA 含量呈先上升后缓慢下降的趋势, 1 d 后, 各株系 MDA 含量均增加, 野生型 MDA 含量为 $3.34 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (蛋白), 明显高于转基因株系的 $2.08 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (蛋白), 是转基因株系的 1.6 倍。3~5 d 后, MDA 含量逐渐减少, 野生型植株的 MDA 含量显著高于转基因植株(图 5-B), 说明 2,4-D 对玉米植株 MDA 含量影响是一个持续积累的过程, MDA 含量高代表膜脂过氧化程度深。

3.3 2,4-D 对转 *TfdA* 基因玉米抗氧化能力的影响

研究结果显示, 2,4-D 处理后, 植株叶片中 CAT 活性发生变化。1 d 时, 野生型和转基因植株的 CAT 活性均上升, 但转基因植株上升的 CAT 活性是野生型的 2.6 倍。3 d 后, 野生型植株的 CAT 活性下降, 但转基因的 CAT 活性仍上升达到峰值, 是野生型 CAT 峰值的 1.4 倍。在处理期间, 转基因株系的 CAT 活性均极显著高于野生型(图 6-A)。随着 2,4-D 处理时间的延长, 植株叶片中 SOD 活性呈先下降后上升再下降的趋势。野生型 SOD 的下降幅度明显大于转基因株系, 转基因植株在处理 3 d 时出现峰值, 而野生型推迟在 5 d 时出现峰值, 且其峰值要

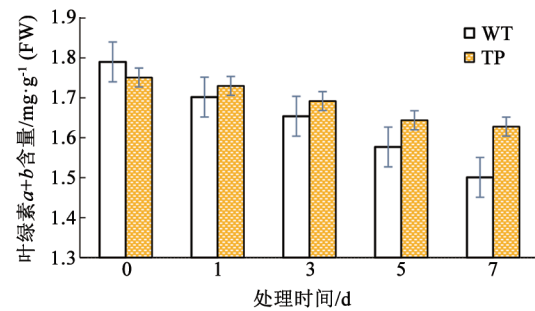
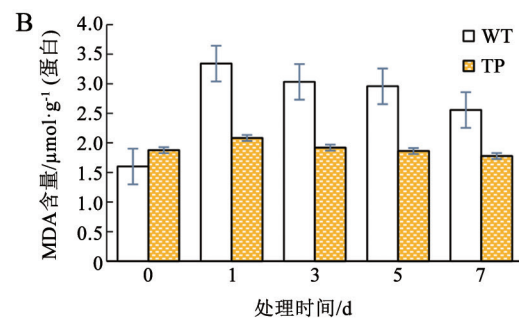


图 4 2,4-D 对转基因玉米叶绿素含量的影响

Fig.4 Effect of 2,4-D on chlorophyll content of transgenic maize



明显低于转基因植株, 转基因植株的最高 SOD 活性为野生型植株的 1.65 倍。2,4-D 处理后, 同期转 *TfdA* 基因玉米的 SOD 活性均极显著高于野生型(图 6-B)。野生型植株的 POD 活性随 2,4-D 处理时间的延长不断下降, 而转基因植株的 POD 活性先下降, 3 d 时反而显著上升达到峰值 $31.56 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白), 是野生型的 1.7 倍。各处理阶段转基因植株的 POD 活性均极显著高于野生型植株(图 6-C)。以上结果说明了 *TfdA* 基因在玉米植株中的表达可以提高其抗氧化的能力, 减少除草剂对玉米植株的影响。

讨 论

在玉米田中施用 2,4-D 灭除杂草时, 可能会对玉米产生药害, 轻则使植株叶片变窄、皱褶、卷曲, 心叶扭曲呈鞭状倒向一侧, 变硬呈葱状, 不展开, 不抽雌雄穗, 重则导致植株死亡, 严重影响玉米的正常生长和产量。实验室前期研究的来源于 *C. campinensis* BJ71 菌株的 *TfdA* 基因对 2,4-D 具有较强的降解能力, 单子叶植物玉米能以茎尖为受体进行外源基因的遗传转化(安立昆和赵德刚 2014),

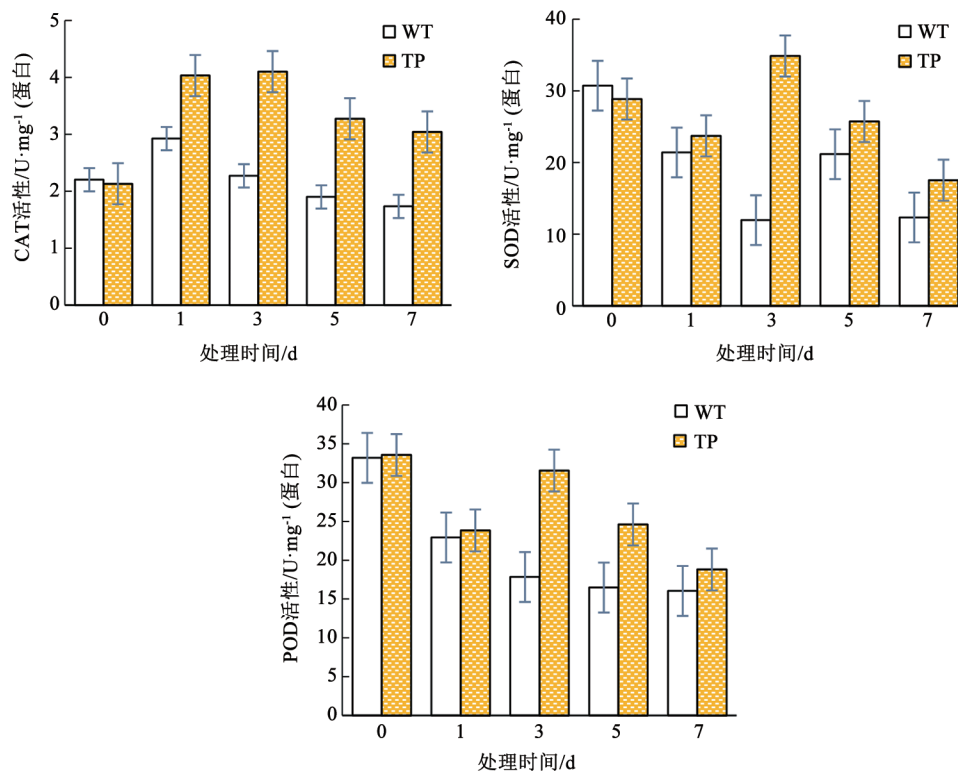


图6 2,4-D处理条件下玉米CAT、SOD和POD活性变化
Fig.6 Changes of enzyme activities in maize plants treated by 2,4-D

为玉米转化*TfdA*基因提供了理论依据。

本研究以玉米茎尖为转化受体,通过农杆菌介导的遗传转化,首次将降解除草剂2,4-D的*TfdA*基因转入玉米植株体内,得到的转*TfdA*基因玉米对除草剂2,4-D的抗性高于野生型,表明*TfdA*基因可以提高玉米植株对除草剂2,4-D的抗性。2,4-D这类激素型除草剂喷施后,被植物体的根、茎、叶吸收,并由木质部或韧皮部向上或向下传导,抑制分生组织的分化,促使杂草茎部组织核酸和蛋白质的合成增加,植株伸长生长停止,或产生横向生长,导致根、茎肿胀,堵塞输导组织,破坏其自身天然激素水平的平衡,使植物畸形发育,产生生理紊乱,影响植株的正常生长(Shin和Jung 2006)。

有资料报道,2,4-D破坏了叶片内叶绿素含量(Ralph 2000)。叶绿素含量测定表明,随着2,4-D处理时间的延长,野生型植株的叶绿素含量的降幅极显著高于转基因植株。 H_2O_2 含量的增加和叶绿素的丢失紧密相关。DAB染色后发现,经过2,4-D处理,初步检测出野生型植株中 H_2O_2 的聚集情况明

显多于转基因植株。在非生物胁迫引起的逆境条件下,细胞的活性氧代谢失调,积累至超过膜伤害临界值,导致膜脂过氧化作用增加。MDA是膜脂过氧化的主要产物之一,具有很强的细胞毒性,对膜和细胞中许多功能分子如蛋白质、核酸、酶等均有强烈的破坏作用,并能引起生物膜的结构损伤(李明和王根轩2002;陈少裕1989)。在2,4-D处理条件下转*TfdA*基因玉米的MDA含量明显低于野生型植株,说明转基因玉米可能通过某种途径快速消除氧化物质的产生而使细胞膜得以较好保护。

大量研究指出,当植物处于逆境时,植物体内源保护酶系可以有效地清除 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧,使植物减轻或免受伤害。在保护酶系中,SOD活性能维持自由基产生,降低膜脂过氧化(江福英等2002)。和野生型植株相比,转基因植株SOD峰值出现早、含量高、降幅低,使转基因玉米对除草剂2,4-D表现出更强的适应性。而CAT、POD等保护酶与SOD的协调作用可进一步将 H_2O_2 转变为 H_2O ,使细胞内形成防御毒害的保护机制,活性氧

维持在较低的水平(Fridovich 1995)。本研究中CAT、POD活性都随时间的延长发生变化。转基因植株CAT活性达到峰值时野生型对照却开始下降; POD活性在处理期间变化波动大, 呈现下降后上升再下降的趋势。王鑫等(2008)发现罂粟(*Papaver somniferum*)植株体内保护酶系统随2,4-D处理时间的延长发生变化, POD活性在处理期间内变化波动较大; SOD呈现先降低后升高的趋势, 第3天活性最低。此结论与本研究结果一致。

转*TfdA*基因玉米在2,4-D胁迫下通过降低H₂O₂的积累和MDA的含量, 提高自身抗氧化酶系(CAT、SOD、POD)活性以增强其对除草剂2,4-D的抗性, 为抗除草剂玉米新品种的培育提供理论参考。

参考文献

- An LK, Zhao DG (2014). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize shoot apical meristem and detection of transgenic maize with *TPS1* gene and *VlmybA2* gene. *Genom Appl Biol*, 33 (3): 578–584 (in Chinese with English abstract) [安立昆, 赵德刚(2014). 农杆菌介导的玉米茎尖遗传转化研究及转*TPS1*基因*VlmybA2*基因玉米鉴定, 基因组学与应用生物学, 33 (3): 578–584]
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 24 (1): 1–15
- Cheng SY (1989). Relationship between membrane lipid peroxidation and the stressed plants. *Chin Bull Bot*, 6 (4): 211–217 (in Chinese) [陈少裕(1989). 膜脂过氧化与植物逆境胁迫. 植物学通报, 6 (4): 211–217]
- Daudi A, O'Brien JA (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio-protocol*, 2 (18): e263
- Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 64: 97–112.
- Grossmann K (2009). Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag Sci*, 66 (2): 113–120
- Han JW, Jiang W, Xue C (2011). Herbicide 2,4-D butylate on the economic crop injury and prevention methods. *Mod Agr*, (5): 70 (in Chinese) [韩金伟, 姜巍, 薛闯(2011). 除草剂2,4-D丁酯对经济作物产生药害及防治方法. 现代农业, (5): 70]
- Han LZ, Zhao DG, Li CC (2015). Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Braz J Microbiol*, 46 (2): 433–441
- Hu JP, Li MQ, Yang FR, Hu GF, Fu JY, Qin YT (2013). Weed control effect of 11 herbicides in the whole film and double furrow sowing corn field. *Weed Sci*, 31 (3): 26–31 (in Chinese with English abstract) [胡景平, 李敏权, 杨发荣, 胡冠芳, 付金元, 秦一统(2013). 11种除草剂对全膜双垄沟播玉米田杂草的防治效果. 杂草科学, 31 (3): 26–31]
- Jiang FY, Li Y, Weng BQ (2002). Review on physiology of chilling stress and chilling resistance of plants. *Fujian J Agr Sci*, 17 (3): 190–195 (in Chinese with English abstract) [江福英, 李延, 翁伯琦(2002). 植物低温胁迫及其抗性生理. 福建农业学报, 17 (3): 190–195]
- Jin CX (2010). Effect trials of different herbicides control weeds in corn field. *Gansu Agr Sci Technol*, (1): 25–27 (in Chinese with English abstract) [靳彩霞(2010). 不同除草剂防除玉米田杂草的效果试验. 甘肃农业科技, (1): 25–27]
- Khoury CK, Bjorkman AD, Dempewolf H, Ramirez-Villegas J, Guarino L, Jarvis A, Rieseberg LH, Struik PC (2014). Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (11): 4001–4006
- Li CC, Han LZ, Zhao DG (2015). Transgenic with *TfdA* gene to improve the ryegrass of herbicide 2,4-D resistance. *Mol Plant Breeding*, 13 (9): 2076–2082 (in Chinese with English abstract) [李翠翠, 韩丽珍, 赵德刚(2015). 转*TfdA*基因提高黑麦草抗除草剂2,4-D能力. 分子植物育种, 13 (9): 2076–2082]
- Li M, Wang GX (2002). Effect of drought stress on activities of cell defense enzymes and lipid peroxidation in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Acta Ecol Sin*, 22 (4): 503–507 (in Chinese with English abstract) [李明, 王根轩(2002). 干旱胁迫对甘草幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响. 生态学报, 22 (4): 503–507]
- Li YL, Hu GJ (2006). Research advance of transgenic maize. *Chin Agr Sci Bull*, 22 (2): 71–75 (in Chinese with English abstract) [李余良, 胡建广(2006). 转基因玉米研究进展. 中国农学通报, 22 (2): 71–75]
- Liao HG, Han CZ (2011). Investigation and control measures of weed species in maize fields. *Hunan Agr Sci*, (14): 55–56 (in Chinese) [廖华刚, 韩昌志(2011). 玉米田杂草种类调查与防控措施. 湖南农业科学, (14): 55–56]
- Ralph PJ (2000). Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll *a* fluorescence. *Aquat Bot*, 66: 141–152
- Shin HS, Jung DG (2006). Determination of chlorine dioxide in mater by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1123: 92–97
- Su SQ, Teng CH, Chen L (2013). The status of auxinic herbicides and development of resistance crops. *Agrochemicals*, 52 (6): 391–393 (in Chinese with English abstract) [苏少泉, 滕春红, 陈良(2013). 激素类除草剂的现状与抗激素除草剂作物的发展. 农药, 52 (6): 391–393]
- Wang X, Guo PY, Yuan XY, Yao MS (2008). Effect of 2,4-D on the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Acta Ecol Sin*, 28 (3): 1098–1103 (in Chinese with English abstract) [王鑫, 郭平毅, 原向阳, 姚满生(2008). 2,4-D丁酯对罂粟(*Papaver somniferum* L.)保护酶活性及脂质过氧化作用的影响. 生态学报, 28 (3): 1098–1103]
- Wright TR, Lira JM, Merlo DJ, Arnold NL (2015). Herbicide Resistance Genes. United States Patent No.: US 9127289 B2. 2015-09-08
- Zhang YJ, Zhang DS, Liu ZY, Pan TX, Li JM, Pan YJ, Song JK (2003). Phytotoxicity and safety of phenoxyacid herbicides. *Agrochemicals*, 42 (1): 41–43 (in Chinese) [张玉聚, 张德胜, 刘周扬, 潘同霞, 李菊梅, 潘月菊, 宋敬魁(2003). 苯氧羧酸类除草剂的药害与安全应用. 农药, 42 (1): 41–43]

Improvement of 2,4-D resistance by introduction of *TfdA* gene via genetic transformation in *Zea mays*

WANG Bi-Wei^{1,*}, QIN Li-Jun^{1,*}, ZHAO De-Gang^{1,2,**}

¹The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), Institute of Agro-Bio-Engineering/College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China

Abstract: In this study, the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degradating gene *TfdA* was introduced into *Zea mays* via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated stem-tip transformation and 2,4-D-resistance maize plants were identified. After spraying 20 g·L⁻¹ 2,4-D solution for 2 days, we found that 91% of wild-type maize plants developed damage symptoms of root and stem swelling deformities, lateral growth, leaf yellowing, etc., while the transgenic plants grew well with little symptoms. Over time, the chlorophyll content in both transgenic and non-transgenic maize plants began to decrease gradually after 2,4-D treatment, but the decreasing amplitude of chlorophyll content in the latter was highly significantly higher than that in the former. After 2,4-D treatment, the results of the H₂O₂-staining by diaminobenzidine (DAB) and malonaldehyde (MDA) contents detection showed that there were highly significantly higher H₂O₂ accumulation and MDA content in the leaves of wild-type plants compared to those in transgenic maize plants. The MDA contents in non-transgenic and transgenic plants were 2.09 and 3.34 μmol·g⁻¹ (protein), respectively. At 3 days after 2,4-D treatment, the maximum of enzyme activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) in transgenic maize plants were 34.88, 4.10 and 31.56 U·mg⁻¹ (protein), respectively, which were 1.65, 1.4 and 1.7 folds higher than these in wild-type ones. In summary, the introduction of *TfdA* gene improves 2,4-D resistance in transgenic maize plants significantly.

Key words: *Zea mays*; 2,4-D; *TfdA* gene; herbicide

Received 2017-03-28 Accepted 2017-05-02

This work was supported by National Major Project of Science and Technology for Cultivation of New Genetically Modified Breeds (Grant No. 2016ZX08010003-009), and Special Project of Guizhou Provincial Department of Science and Technology for Transgenesis Research (Grant No. 2004NGZ004).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: dgzhao@gzu.edu.cn).