

超甜玉米转基因稳定高效再生体系的建立及转化植株PCR分析*

李余良¹, 胡建广¹, 苏 菁², 刘建华¹

(1 广东省农业科学院 作物研究所, 广东 广州 510640; 2 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275)

[摘 要] 为了通过对影响超甜玉米再生因素的研究, 建立超甜玉米转基因再生技术体系, 获得抗虫资源。以超甜玉米幼胚为愈伤组织诱导外植体, 利用基因枪法将苏云金杆菌杀虫蛋白基因转化胚性愈伤组织, 通过优化再生和生根培养条件建立了稳定、高效的超甜玉米转基因再生体系。结果表明, 随着愈伤组织继代时间的延长, 再生成苗率降低, 再生成苗越难; 除草剂Basta对愈伤组织筛选的最适质量浓度为8 mg/L, 愈伤组织预分化的最适培养基为MS+ 40 g/L 蔗糖+ 20 g/L 甘露醇+ 5 0 mg/L ABA, 最适的再生培养基为MS+ 20 g/L 蔗糖+ 2 0 mg/L 6-BA+ 0 1 mg/L NAA, 生根培养基为1/2 MS+ 0 1 mg/L NAA, 对生根不好的小苗附加0 1 mg/L NAA+ 2 0 mg/L BA 或0 2 mg/L NAA+ 3 0 mg/L BA 可以促进生根, 生根率达93%以上。对部分再生转化植株进行PCR分析, 部分植株能够扩增出426 bp片段, 与阳性对照大小相同。试验结果初步证明Bt基因已经导入到玉米植株中。

[关键词] 超甜玉米; 转基因; 幼胚; 植株再生; 再生体系; PCR分析

[中图分类号] S513 035

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0070-05

Establishment of stable and highly efficient plant regeneration system and PCR analysis of transformants in supersweet corn

LI Yu-liang¹, HU Jian-guang¹, SU Jing², LIU Jian-hua¹

(1 Institute of Crop Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China;

2 College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: To establish regeneration technique system for gene transformation in supersweet corn, and to obtain gemplasm resources for insect resistance, the factors influencing plant regeneration were studied. The calli, derived from immature embryos, of the supersweet corn inbred line was transformed with the plasmid DNA containing Bt gene via the particle bombardment-mediated method. Through optimizing regeneration and rooting conditions in supersweet corn immature embryo culture, a stable, highly efficient plant post-transformation regenerating system has been established. The results showed that calli lost their regenerating ability after long-term subcultures. The optimal mass concentration of herbicide Basta was 8 mg/L to immature embryo calli selection; the combination of MS+ 40 g/L sucrose+ 20 g/L mannitol+ 5 0 mg/L ABA was the optimal medium for pre-differentiation of calli; the medium of MS+ 20 g/L sucrose+ 2 0 mg/L 6-BA+ 0 1 mg/L NAA was the best for differentiation and regeneration; the medium for rooting was 1/2 MS+ 0 1 mg/L NAA, and the rooting rate was increased to above 93% when the medium of 1/2 MS+ 0 1 mg/L NAA+ 2 0 mg/L BA or 1/2 MS+ 0 2 mg/L NAA+ 3 0 mg/L BA was supplied. Genomic PCR analysis of the T₀ individuals demonstrated that some seedlings could amplify 426 bp fragment and showed the same size in comparison with the postive check. The results confirmed that Bt gene has been integrated into the genomes of plants.

Key words: supersweet corn; genetic transformation; immature embryo; plant regeneration; regenera-

* [收稿日期] 2006-02-17

[基金项目] 广东省“十五”重大科技专项(A 202004); 广东省农业科学院院长基金项目(2004-02)

[作者简介] 李余良(1969-), 男, 陕西华县人, 副研究员, 博士, 主要从事甜糯玉米育种及生物技术研究。E-mail: yl_lee@126.com

tion system; PCR analysis

超甜玉米属甜质玉米 (*Zea mays* L. *Saccharata* sturt) 类型, 享有蔬菜、水果玉米之称, 已经成为当今世界重要的栽培作物之一。全世界甜玉米年种植面积达 120 多万 hm^2 , 鲜玉米果穗及其制品是美国、日本、西欧以及东南亚一些国家和地区的重要消费食品之一。华南是我国超甜玉米主产区, 超甜玉米已成为广东的特色和优势作物^[1]。但玉米螟对超甜玉米危害极为严重, 导致其产量和品质下降, 目前生产上利用的超甜玉米品种普遍表现抗性不强, 特别是甜度高、食味好的优质品种抗虫能力更差, 而超甜玉米本身缺少有效的抗虫基因资源, 难以通过常规育种在短期内获得抗性品种, 因此利用植物转基因技术培育抗虫品种, 是当前超甜玉米育种的重要方向^[2-4]。虽然玉米组织培养技术已取得了很好的突破, 幼胚、幼胚诱导的愈伤组织、分生组织等受体材料被作为基因瞬时表达和稳定转化的外植体, 但多数玉米自交系或品种的愈伤组织在离体培养时分化

再生频率很低, 制约了玉米转基因研究^[5-7]。超甜玉米胚乳糖分含量高, 胚生活力弱, 对其组培特性还不清楚, 而且通过组培进行转基因的研究报道也不多。本文以超甜玉米幼胚为材料, 对影响超甜玉米的再生因素进行了研究, 建立了稳定高效的再生体系, 为进一步开展超甜玉米抗虫基因工程育种提供试验条件和技术平台。

1 材料与方法

1.1 供试材料与培养基

供试的超甜玉米自交系 1132, 由广东省农业科学院作物研究所提供。重组质粒 pFW Z16, 携带苏云金杆菌杀虫蛋白基因 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 和 1 个选择标记基因 bar, 由 Act1 和 CaMV35S 启动子驱动, 长度为 9 kb, 由美国康乃尔大学构建, 广东省农业科学院作物研究所玉米室保存 (图 1)。

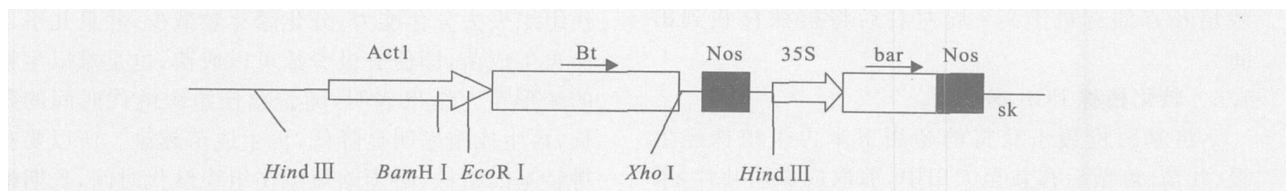


图 1 重组质粒 pFW Z16 表达载体图

Fig 1 Construction of plant expression vector pFW Z16

愈伤组织诱导培养基: N 6+ 300 mg/L 谷氨酰胺+ 500 mg/L 水解酪蛋白+ 700 mg/L 脯氨酸+ 9 mg/L AgNO_3 + 20 g/L 蔗糖+ 20 mg/L 2, 4-D+ 27 g/L 植物凝胶, pH 5.8; 愈伤组织继代培养基: 诱导培养基+ 20 mg/L ABA, pH 5.8; 高渗培养基: 诱导培养基+ 20 mg/L ABA+ 甘露醇 0.2 mol/L+ 山梨醇 0.2 mol/L, pH 5.8。

1.2 胚性愈伤组织诱导

超甜玉米自交系 1132 播种于广东省农业科学院作物研究所大丰试验基地, 人工套袋自交, 取授粉 9~11 d 的幼果穗, 用体积分数 70% 酒精表面消毒, 无菌水漂洗 1 次, 再用体积分数 15% 次氯酸钠溶液浸泡 20~25 min 后, 无菌水冲洗 3~4 次。小心挑出幼胚, 接种于诱导培养基上, 26 °C 暗培养 3~4 周后, 挑取色泽淡黄、致密、颗粒状、干燥的胚性愈伤组织为转化受体或转接于继代培养基上培养。

1.3 基因枪转化

基因枪轰击前 4~6 h, 选生长发育旺盛、色泽

良好并已夹碎至 2~3 mm 的胚性愈伤组织, 转移到含高渗培养基 6 cm 培养皿中。按照 Klein 等^[8]的方法制备金粉悬浮液 (金粉直径 1.0 μm 或 1.6 μm , 质粒 DNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。采用 PDS-1000/He 型基因枪, 将包裹质粒 DNA 的金粉微粒装载就绪, 把有胚性愈伤组织的培养皿放入基因枪样品室, 样品真空度 8.799 MPa, 靶细胞与微粒载体距离为 9 cm, 每皿轰击 1~2 次。轰击后的胚性愈伤组织培养 16~18 h 后转移到继代培养基上, 在 26 °C 黑暗条件下恢复培养 3 d。

1.4 再生体系优化

1.4.1 除草剂 Basta 抗性筛选 在继代培养基中分别附加不同质量浓度的除草剂 Basta (2, 5, 8, 10, 15 mg/L), 筛选玉米愈伤组织对除草剂 Basta 的适宜抗性质量浓度。26 °C 暗培养 2 周, 观察愈伤组织生长情况, 每 2~3 周转移 1 次, 共筛选 3 次, 每次都挑选生长良好的抗性愈伤组织进行下一轮筛选。

1.4.2 愈伤组织预分化培养 将抗性愈伤组织转入预分化培养基进行预分化培养。预分化培养基为,

MS 基本培养基附加不同质量浓度的蔗糖(20, 40 g/L), 甘露醇(0, 20 g/L), ABA (3 0, 5 0 mg/L), 加入植物凝胶 2 7 g/L, 调 pH 值为 5 8。26 °C 暗培养 10 d 左右, 观察愈伤组织生长状况, 统计愈伤组织胚性保持率。

1 4 3 植株分化再生 将获得的良好状态的愈伤组织转入分化培养基进行芽的诱导。分化培养基为 MS 基本培养基附加不同质量浓度的蔗糖(20, 40, 60 g/L), 6-BA (2 0, 3 0 mg/L), NAA (0 1, 0 2 mg/L), 加入植物凝胶 2 7 g/L, 调 pH 值为 5 8。在 26 °C, 光照 16 h 条件下培养。2 周后观察记录芽及再生苗的生长情况。

1 4 4 植株生根培养与移栽 当植株诱导出小苗后转入生根培养基。生根培养基为 1/2 MS 附加不同质量浓度的 NAA (0 1, 0 2 mg/L), BA (0, 2 0, 3 0 mg/L), 加入植物凝胶 2 7 g/L, 调 pH 值为 5 8。在 26 °C, 光照 16 h/d 条件下培养。2 周后观察统计根的生长情况。当发育成 5~8 cm 的完整小苗后经炼苗选生长健壮的植株移栽到花盆中(基质为栽培花卉的有机土), 2 周左右后将植株移栽到田间。

1 5 转化植株 PCR 分析

将基因枪轰击获得的超甜玉米再生植株经生根、壮苗、炼苗后移栽至大田中, 剪取成株期叶片, 采用 CTAB 法^[9]提取总 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物: 依据质粒表达载体中 CaMV35S 启动子序

列设计。P-35S 的序列: 5'-GCA ATG GAA TCC GAG GAG-3', P-35A S 的序列: 5'-CAC ATG AGC GAA AAC CTA TAG G-3'。PCR 反应体系: 模板 DNA 50~100 ng, 10×Buffer 2 0 μL, 2 mmol/L dNTP 1 0 μL, 5 mmol/L Primer-S 2 0 μL, 5 mmol/L Primer-A S 2 0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1 6 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0 2 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。电泳检测。

2 结果与分析

2 1 超甜玉米稳定高效再生体系的建立

2 1 1 愈伤组织继代时间对植株再生的影响 玉米愈伤组织再生植株主要依赖于基因型, 但其继代时间与植株再生也存在很大关系。从表 1 可以看出, 继代时间在 50 d 以内, 愈伤组织分化再生能力强, 再生成苗率高达 28% 以上; 而 72 d 时再生成苗率只有 6 67%; 至 90 d 时仅为 2 27%, 继代 90 d 后, 愈伤组织失去分化能力, 分化绿芽数减少, 并且几乎不能再生成苗, 即使有极少数可以成苗, 也是难以生根的畸形苗。结果表明, 随着愈伤组织继代时间的延长, 再生成苗率明显降低, 再生成苗越难。所以要获得转基因植株, 必须缩短愈伤组织继代时间, 长期继代不利于植株再生。

表 1 愈伤组织继代时间对超甜玉米植株再生的影响

Table 1 Effect of subculture time of callus on regeneration

继代时间/d Subculture time	接种愈伤组织数 No. of callus	分化绿芽数 No. of regenerated shoot	再生成苗数 No. of plants regeneration	再生成苗率/% Regeneration percentage
20	53	46	16	30 19
32	110	78	31	28 18
50	96	69	27	28 13
72	45	20	3	6 67
90	44	11	1	2 27
120	44	5	0	0
150	30	5	1*	3 33

注: * 表示畸形苗。Note: * mean abnormal plantlet

2 1 2 除草剂 Basta 抗性筛选结果 适宜的除草剂抗性质量浓度, 可以有效地筛选到可能含有外源基因的转化体, 在遗传转化中是必不可少的环节。试验观察结果表明, 附加 2 mg/L 除草剂 Basta 的选择培养基上愈伤组织生长状况良好; 附加 5 mg/L 除草剂 Basta 的处理愈伤组织生长缓慢, 出现部分褐化现象, 愈伤组织存活率为 28%; 附加 8 mg/L 除草剂 Basta 的处理, 愈伤组织褐化加重, 有

效抑制了愈伤组织的生长, 愈伤组织存活率低, 仅为 13%; 附加 10 mg/L 以上除草剂 Basta 的处理, 所有愈伤组织褐化死亡。因此, 将 8 mg/L 除草剂 Basta 作为转化后愈伤组织抗性筛选的质量浓度。

2 1 3 预分化对愈伤组织状态的影响 基因枪转化后经 3 轮的除草剂 Basta 抗性筛选, 选择后的抗性愈伤组织可以直接分化再生。为了使抗性愈伤组织保持良好的胚性状态并提高分化再生率, 有必要

增加一轮预分化环节。从表2可以看出, 不加甘露醇时愈伤组织胚性保持率最低, 表现为愈伤组织状态差, 呈水浸状; 附加20 g/L 甘露醇时, 愈伤组织胚性保持率显著提高; ABA 质量浓度从30 mg/L 增加到50 mg/L 时, 胚性保持率可提高16.45%~23.97%。在5个处理中, 40 g/L 蔗糖+20 g/L 甘露醇+50 mg/L ABA 组合的胚性保持率达100%, 愈伤组织状态良好、疏松, 呈颗粒状, 为最佳组合。

表2 预分化对超甜玉米愈伤组织状态的影响
Table 2 Effect of pre-differentiation on callus state

蔗糖/(g · L ⁻¹) Sucrose	甘露醇/(g · L ⁻¹) Mannitol	ABA/ (mg · L ⁻¹)	接种愈伤组织数 No. of callus incubated	胚性保持率/% Embryonic maintenance percentage
40	20	50	51	100.00
20	20	50	51	62.75
20	20	30	49	38.78
20	0	50	49	22.45
20	0	30	50	6.00

2.1.4 蔗糖和激素对比对愈伤组织分化再生的影响 愈伤组织分化再生受许多因素的影响, 其中培养基中蔗糖质量浓度和激素种类及其配比是很重要的影响因素。表3结果表明, 当蔗糖质量浓度为20 g/L 时, 愈伤组织平均分化率和再生率最高; 6-BA 和NAA 质量浓度组合为2.0 mg/L + 0.1 mg/L

时, 愈伤组织分化率较高。在所有6个处理中, 20 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 组合显著促进了愈伤组织分化和植株再生, 分化率和再生率最高, 分别为81.13%和35.85%。因此, 本试验筛选到的稳定、高效的再生培养基为:MS+20 g/L 蔗糖+2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA。

表3 蔗糖和激素对比对超甜玉米愈伤组织分化再生的影响
Table 3 Effect of combination of sugar and hormone on callus differentiation

蔗糖/ (g · L ⁻¹) Sucrose	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种愈伤组织数 No. of callus incubated	分化绿芽数 No. of regenerated shoot	再生苗数 No. plants regeneration	分化率/% Differentiation percentage	再生率/% Regeneration percentage
20	3.0	0.2	57	35	13	61.40	22.81
20	2.0	0.1	53	43	19	81.13	35.85
40	3.0	0.2	66	38	9	57.58	13.64
40	2.0	0.1	58	34	10	58.62	17.24
60	3.0	0.2	58	22	7	37.93	12.07
60	2.0	0.1	56	29	4	51.79	7.14

2.1.5 再生植株生根培养与移栽 将2~3 cm 的再生小苗转入生根培养基(1/2 MS + 0.1 mg/L NAA)中, 再生苗的生根率达到57.72%。对生根不好的小苗, 将其转移至附加0.1 mg/L NAA + 2.0

mg/L BA 的培养基中, 生根率提高到93.96%, 形成的根较粗, 根数较多; 对很难生根的小苗转移至附加0.2 mg/L NAA + 3.0 mg/L BA 的培养基中, 生根率达到98.66%, 但畸形苗明显增加(图2)。

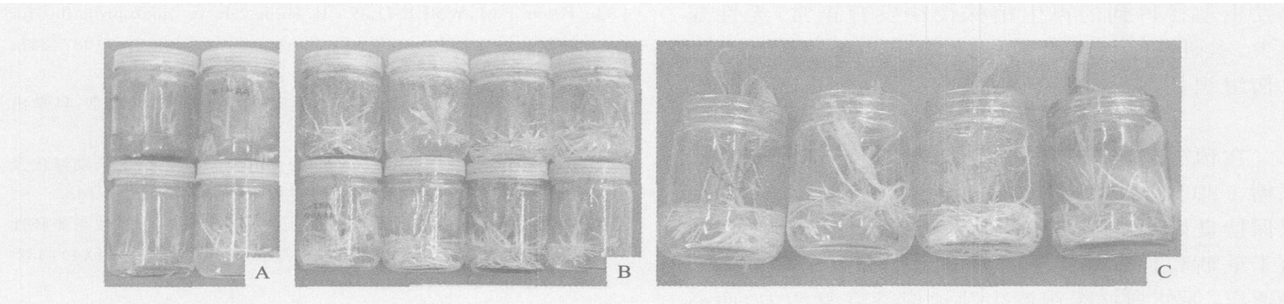


图2 不同激素对比对再生苗生根的影响
A. 1/2MS+0.1mg/L NAA 培养基中生根不好的植株; B. 1/2MS+0.1mg/L NAA+2.0mg/L BA 培养基中的生根情况;
C. 1/2MS+0.2mg/L NAA+3.0mg/L BA 培养基中的生根情况

Fig. 2 Effect of hormone in medium on rooting
A. No-rooting plants in 1/2MS medium containing 0.1mg/L NAA; B. Rooting plants in 1/2MS medium containing 0.1mg/L NAA + 2.0mg/L BA; C. Rooting plants in 1/2MS medium containing 0.2mg/L NAA + 3.0mg/L BA

小苗经历 2 周左右形成发达的根系,用清水洗掉粘附在根系上的培养基,将其移栽到盛有营养土的花盆中生长,在生长期补充水分及 1/10 的 MS 液体培养基,散射光下练苗 2 周后移栽至大田,成活 128 株。

2.2 再生转化植株 PCR 分析

对再生植株进行 PCR 分析,部分单株能够扩增出和阳性对照大小相同的目的片段,大小为 426 bp,初步证明 Bt 基因已经导入到超甜玉米植株中(图 3)。

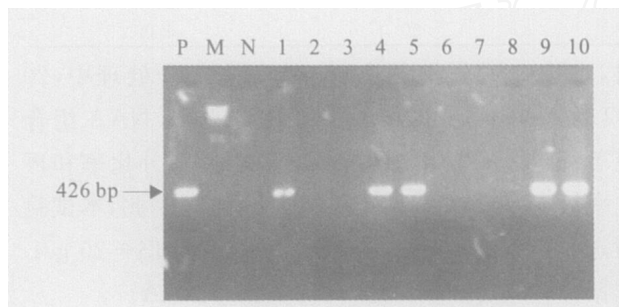


图 3 T₀ 植株 PCR 分析

M. DNA 分子量标准 λ /H indIII; P. 质粒 pFW Z16;

N. 未转化植株; 1~10 T₀ 植株

Fig 3 PCR analysis of T₀ plants

M. L adder DNA; P. Positive check; N. Negative check;

1- 10 T₀ plants

3 结论与讨论

基因枪转化后愈伤组织能否分化、再生、成株,直至最后移栽成活,直接关系到遗传转化的成败。研究认为,愈伤组织长期继代后细胞无性变异增加,再生能力下降或再生植株发育畸形^[10-11]。再生植株发生途径有器官发生和胚状体发生两种形式,由胚状体发生途径得到的再生植株往往发育正常,无性变异少。本研究结果表明,在超甜玉米组织培养过程中愈伤组织长期继代后再生成苗率降低,易产生畸形苗。

在预分化培养中,最佳质量浓度组合为 40 g/L 蔗糖+ 20 g/L 甘露醇+ 50 mg/L ABA 时,愈伤组织保持良好的胚性状态,胚性保持率达 100%。这是由于蔗糖和甘露醇质量浓度的增加提高了培养基的渗透压,促使愈伤组织产生胁迫应答恢复活力,而高质量浓度的 ABA 可明显改善愈伤组织生长状态,使愈伤组织结构致密,胚性形成和保持能力提高。

外源激素在玉米愈伤组织芽尖分化、再生以及生根壮苗过程中具有十分重要的作用^[12-13]。低质量浓度的蔗糖配合 20 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L

NAA,有利于愈伤组织分化和植株再生。在生根培养中,NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,再生苗可以生根,不易产生大量的畸形苗;对生根不好或难以生根的再生苗附加 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L BA 或 0.2 mg/L NAA + 3.0 mg/L BA,能够促进生根和根系生长。

本试验对愈伤组织再生、生根培养和移栽等条件进行了优化,建立了稳定、高效的超甜玉米转基因再生体系:以幼胚为外植体诱导愈伤组织,在遗传转化后,经 3 轮抗性筛选转入预分化培养基进行分化再生、生根培养、移栽成株,PCR 初步检测目的基因已整合到再生植株中。

[参考文献]

- [1] 李余良,方志伟,胡建广,等. 粤甜 3 号栽培密度与农艺性状的动态关系[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 144-145
- [2] 李余良,胡建广,苏菁,等. 子房注射将 Bt 基因导入超甜玉米[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 41-43
- [3] 杨春英,宋建成. 转 Bt 毒蛋白基因玉米及其抗虫性研究进展[J]. 玉米科学, 2001, 9(1): 88-93
- [4] 王国英,张宏,谢友菊,等. 玉米胚性愈伤组织转化及转 Bt 基因植株的抗虫性[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(3): 49-53
- [5] Schlappi M, Hohn B. Competence of immature maize endosperms for *Agrobacterium* mediated gene transfer[J]. The Plant Cell, 1992, 4: 7-16
- [6] Ishida Y, Saito H, Ohta S. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 745-750
- [7] Hodges T K, Kamo K K, Imbrie C W. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize[J]. Biotechnology, 1986, 4: 219-223
- [8] Klein T M, Wolf E D, Wu R. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells[J]. Nature, 1987, 327: 70-73
- [9] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 600-602
- [10] 向凤宁,张举仁,陈惠民,等. 玉米胚性愈伤组织的长期继代及其染色体分析[J]. 西北植物学报, 1994, 14(3): 157-163
- [11] 黄璐,卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 332-338
- [12] Register J C, Peterson D J, Bell P J. Structure and function of selectable and non selectable in maize after introduction by particle bombardment[J]. Plant Mol Biol, 1994, 25: 951-961
- [13] 李慧芬,何德洁,王兴智,等. 玉米优良自交系愈伤组织基因转化的研究[J]. 遗传学报, 1999, 26(4): 397-402