

文章编号:1005-0906(2003)01-0007-03

利用基因枪法将 Bt 基因导入玉米优良自交系

张红梅^{1,2,3}, 贾利敏², 王国英³, 谭振波²

(1. 山西省农业科学院玉米研究所, 忻州 034000; 2. 北京市农林科学院北京农业生物技术中心, 北京 100089;

3. 中国农业大学生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘 要: 利用基因枪法将 Bt 基因导入玉米优良自交系 501 和 C111。轰击后的幼胚转至附加 Bialaphos 浓度为 10 mg/L 的选择培养基上进行愈伤组织的诱导, 继代筛选 3 轮, 每轮 3 周。得到的抗性愈伤组织在不含 Bialaphos 的分化培养基上进行绿苗分化, 501 获得了 20 株转化再生植株, C111 获得了 10 株转化再生植株, PCR 鉴定结果表明 Bt 基因已整合到玉米自交系 501 和 C111 的基因组中。

关键词: 玉米优良自交系; 基因枪; Bt 基因

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Transfer of Bt Gene into Maize Elite Inbred Line 501 and C111 by Microprojectile Bombardment

ZHANG Hong-mei^{1,2,3}, JIA Li-min², WANG Guo-ying³, TAN Zhen-bo²

(1. Maize Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences. Xinzhou 034000;

2. Beijing Agro-biotechnology Reserch Center,

Beijing Academy of Agricultural & Forestry Sciences. Beijing 100089;

3. The National Key Lab of Agricultural Bio-technology, China Agricultural University. Beijing 100094, China)

Abstract: The immature embryos of elite inbred line of 501 and C111 were bombarded by microprojectile bombardment. The calli were induced from the bombarded immature embryos were then 20 transformants of 501 and 10 transformants of C111 were obtained from resistant calli which had been subcultured on selecting medium containing 10 mg/L Bialaphos for 60 days. The result of PCR amplification implied that the Bt gene had been introduced into maize inbred lines 501 and C111.

Key words: Maize elite inbred line; Microprojectile bombardment; Bt gene

玉米螟分布较广, 它严重危害着玉米的产量和质量。在玉米虫害的综合防治中, 利用基因工程手段培育抗虫玉米取得了一系列的进展。Bt 毒蛋白基因来源于苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*), 它编码的 Bt 毒蛋白是苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中产生的结晶蛋白, 具有特异性的杀虫活性, 其杀虫机制是使取食昆虫中肠膜穿孔, 致使昆虫停止取食, 最后导致死亡。1990 年孟山都公司和山迪卡公司用基因枪法获得了正常结实的抗虫转基因玉米, 1996 年转基因抗虫玉米在美国首次商业化种植。我国的抗虫转基因玉米进展也较大, 但作为受体的玉

米材料仍局限于少数易于遗传转化的材料, 如 A118、B73 及其衍生系等^[1~5], 将这些转化后的材料用于生产, 实际上还必须经过若干代的回交转育, 与此同时也会带入一些不需要的或不良的基因。如果将目的基因导入目前应用于生产的优良自交系中, 使其成为新系直接在生产上利用, 将会加快改良玉米品种的步伐^[10~11]。本试验是将抗鳞翅目昆虫基因 GFMcry1A 导入目前生产上常用的北京早熟玉米自交系 501 和 C111 中。

1 材料与方法

1.1 供试材料

玉米自交系 501、C111 种子由北京市农林科学院作物所提供。质粒 pMG15(图 1)由中国农业大学生物技术国家重点实验室提供。

收稿日期: 2002-09-24

作者简介: 张红梅(1966-), 硕士, 山西省农科院玉米研究所助理研究员, 主要从事玉米基因工程研究。

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5001001)和北京市高技术基金项目(953850100)资助。



图 1 pMG15 质粒

1.2 试验方法

1.2.1 玉米幼胚的组织培养 取授粉后 8~13 d 的玉米果穗,去苞叶后在 70%的酒精中浸泡 5 min,取出后用手术刀削去种皮,取出幼胚,接种于诱导培养基上。

1.2.2 培养基 基本培养基: N₆ 大量、B₅ 微量、N₆ 有机、Fe 盐、脯氨酸 690 mg/L、水解酪蛋白 200 mg/L、肌醇 100 mg/L、蔗糖 30 g/L、植物凝胶 2.6 g/L。愈伤组织诱导及继代培养基: 基本培养基附加 2,4-D 2 mg/L 或 Dicamba 3.3 mg/L。选择培养基: 愈伤组织诱导或继代培养基附加不同浓度 Bialaphos (表 2)。分化培养基: 同基本培养基。生根壮苗培养基: 1/2MS 全量附加蔗糖 20 g/L,其它同基本培养基。

1.2.3 基因枪转化及抗性愈伤组织的筛选 玉米幼胚转化前的高渗处理按文献^[3]进行,转化方法见文献^[7]。轰击后的幼胚转至附加 Bialaphos 的选择培养基上继代筛选 3 轮,每轮 3 周。每次淘汰褐化的愈伤组织,选择色泽正常、生长良好的愈伤组织进行继代筛选。

1.2.4 植株的再生及移栽 将抗性愈伤组织转移至分化培养基上,分化苗长出主茎后将其移至生根壮苗培养基上;待幼苗长出 2 片新叶,3~4 条主根后,移至装有营养土(2/3 蛭石+1/3 腐殖质)的小花盆中;当幼苗在小花盆中又长出 1~2 片新叶时,可带土移栽到温室或大田中。

1.2.5 PCR 检测 PCR 引物设计在 Bt 基因编码区内,可特意扩增出 Bt 基因 0.9 kb 的目标序列。引物序列:

上游引物: 5'GGG CCC GCT CAA TCC AAC TGG AGA GGC 3'

下游引物: 5'CCA TAC AAC TGC TTG AGT AAC CCA GAA GTT G3'

PCR反应条件为: 94℃预变性4 min;94℃1 min, 55℃30 s,72℃1 min, 循环 30 次;72℃延伸 10 min, 4℃保存。

用 SDS 法提取转基因玉米叶片总 DNA 作为模板进行 PCR 反应,扩增产物在 0.8%Agrose 凝胶上电泳并在紫外光下检测。

2 结果与讨论

2.1 玉米优良自交系 501 和 C111 幼胚愈伤组织的诱导及其影响因子

取授粉后 8、9、10、11、12 和 13 d 的幼胚,观察幼胚的大小及其对愈伤组织诱导的影响。授粉后 8、9 d 的雌穗,幼胚的大小肉眼还难以分辨。授粉后 10~14 d 的雌穗,授粉日期相同而取材日期不同,幼胚的大小存在差异,取材日期相差 1 天,幼胚大小则相差约 1 mm;如果授粉日期不同,即使幼胚生长了相同的天数,幼胚的大小也不同。这些观察结果表明授粉后气温的高低对玉米幼胚生长速度有一定影响。根据幼胚的大小将其分成小于 1 mm、1~2 mm 和大于 2 mm 三类,接种于诱导培养基上进行愈伤组织的诱导。结果表明小于 1 mm 幼胚的诱导率只有 30%,其产生的愈伤组织也较小,不易生长起来;大于 2 mm 幼胚的胚芽鞘和胚根极易萌发而影响出愈,其诱导率是 48%;1~2 mm 的幼胚,胚芽生长缓慢细弱,一定时间后就自行萎缩;其愈伤组织是从整个盾片开始发生的,呈黄色颗粒状,表面较干燥,所形成的愈伤组织多为 II 型,诱导率均在 90%以上。因此,胚龄以幼胚的大小为确定指标较为合适。

在实验中,我们采用了两种附加不同激素的诱导培养基,一种是附加 2,4-D,另一种是附加 Dicamba,二者在诱导 1~2 mm 幼胚产生愈伤组织的频率上无显著差异,在诱导的愈伤组织质量方面有差异(表 1)。501 在附加 2,4-D 的培养基上诱导的愈伤组织呈黄色光滑、略带水渍状,胚芽粗短;在附加 Dicamba 的培养基上,诱导的愈伤组织则表面呈黄色皱褶、干燥,胚芽相对较细长呈螺旋状。而 C111 在两种培养基上诱导的愈伤组织表面都呈白色皱褶状,同时伴有分化出的细长卷曲叶子;在继代中将 2,4-D 提高至 2.5 mg/L, Dicamba 提高至 4 mg/L,愈伤组织的状态无明显变化。这一结果表明基因型不同对这两种激素的反应不同。

表 1 501 和 C111 幼胚愈伤组织诱导频率

基因型	幼胚(个)	愈伤组织诱导	II 型愈伤组织	愈伤组织的长/宽(cm)
		频率(%)	频率(%)	
501 ¹⁾	153	91.8	41.1	1.08/0.773
501 ²⁾	107	91.5	13.8	0.95/0.73
C111 ¹⁾	141	97.3	48.5	1.18/0.86
C111 ²⁾	161	98.2	47.3	1.17/0.83

1) 表示幼胚在附加 Dicamba 的培养基上;

2) 表示幼胚在附加 2,4-D 的培养基上

2.2 抗性愈伤组织的筛选

轰击后的幼胚在选择培养基上进行愈伤组织的诱导,在选择培养基中附加的 Bialaphos 浓度较高的情况下,诱导出的愈伤组织最初只表现为生长缓慢,当继代筛选达到 6 周时,表现为大部分愈伤组织明

显褐化死亡,少量愈伤组织存活或在褐化愈伤组织上长出少量呈鲜亮的黄色或白色的愈伤组织。在附加 Bialaphos 浓度不同的培养基中,得到抗性愈伤组织的频率也不同(表 2)。在附加 Bialaphos 浓度为 6 mg/L 的选择培养基上,未转化的幼胚愈伤组织的诱导频率为 50%左右,而转化的幼胚达 70%以上;在附加 Bialaphos 浓度为 10 mg/L 的选择培养基上,C111、501 未转化的幼胚愈伤组织的诱导频率分别为 2.3%和 3.7%,而转化的幼胚仍分别达 14.8%和 31.7%。由此可见,随着选择培养基中附加 Bialaphos 浓度的提高,转化和未转化的幼胚愈伤组织的诱导率都降低,而且 C111 比 501 降低的程度更大。这也说明不同基因型对筛选浓度的反应在一定程度上存在差异。

表 2 501 和 C111 在附加不同浓度 Bialaphos 的选择培养基上获得抗性愈伤组织的频率(%)

基因型	抗性愈伤组织的频率(%)							
	0	2	4	6	8	10	15	20
501 ¹⁾	97	100	88.5	79.4	52.1	31.7	23.2	18.9
501 ²⁾	100	100	70.0	50.9	50.0	3.7	-	-
C111 ¹⁾	100	100	85.2	73.8	48.7	14.8	-	-
C111 ²⁾	100	100	75.2	52.7	52.7	2.3	-	-

1) 表示经基因枪转化的玉米基因型材料
2) 表示未经转化的玉米基因型材料

2.3 再生植株的获得

在附加 6 mg/L Bialaphos 选择培养基上得到的抗性愈伤组织接种在附加 4 mg/L Bialaphos 的分化培养基上,未得到再生植株。但是,在附加 10 mg/L 选择培养基上的抗性愈伤组织接种在不含 Bialaphos 的分化培养基上,501 得到了 20 株再生植株,C111 得到了 10 株再生植株(表 3)。这种差异是否是 Bialaphos 对绿苗分化存在抑制作用所造成的,还有待于扩大实验规模进一步验证。501 和 C111 的再生苗经炼苗后移栽到大田,分别成活 2 和 9 株。

表 3 501 和 C111 获得抗性幼胚愈伤组织的频率、分化再生植株的结果

基因型	幼胚(个)	抗性幼胚(个)	分化出再生植株的幼胚(个)
501	850	270	13
C111	519	77	7

分化出的再生植株系	移栽成活的植株	结实株系
20	2	2
10	9	5

2.4 转化植株的 PCR 检测

按照设计的 PCR 引物序列,以质粒 DNA、未转化植株的 DNA、转化植株的 DNA 为模板进行扩增,结果表明,优良自交系 501 转化植株的 2 个株系均为阳性;C111 转化植株的 9 个株系的 PCR 检测结果,8 株呈阳性反应,1 株为阴性(图 2)。我们正在对 PCR 阳性反应的转基因植株及其后代进行 Southern 杂交和抗虫性鉴定。

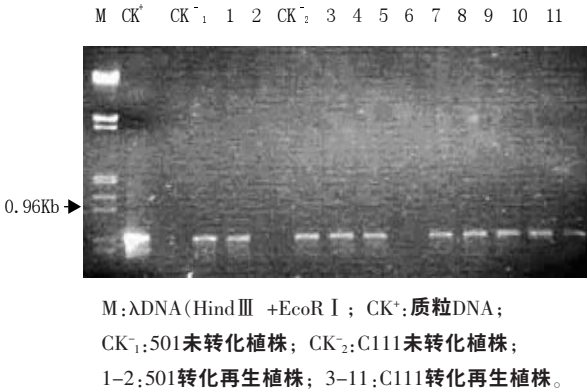


图2 T₀植株的PCR检测

参考文献:

[1] Armstrong C L, Parker G B, Pershing J C, et al. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* [J] . Crop science, 1995, 35: 50-557 .
[2] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize(*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J] . Nature Biotechnology, 1996, 14: 745-750 .
[3] Vain P, McMullen M D, Finer J J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize [J] . Plant Cell Reports, 1993, 12: 84-88 .
[4] Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Managano M L, et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants [J] . Plant Cell, 1990, 2: 603-618 .
[5] Walters D A, Vetsch C S, potts D E, et al. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants [J] . Plant Molecular Biology, 1992, 18: 189-200 .
[6] 王国英,杜天兵,张 宏,等.用基因枪将 Bt 毒蛋白导入玉米及转基因植株再生[J].中国科学,B 辑,1995,25(1):71-76 .
[7] Wan Y C, Widholm J M, Lemaux P G. TypeI callus as a bombardment target for generation fertile transgenic maize (*Zea mays* L) [J] . Planta, 1995, 196: 7-14 .
[8] 张 宏,王国英,谢友菊,等.超声波介导法转化玉米愈伤组织及可育转基因植株的获得[J].中国科学,C 辑,1997,27(2):162-167 .
[9] 郑宏红,戴顺洪,何锬洁,等.籼稻基因枪转化的研究[J].遗传学报,1996,23(4):286-292 .
[10] 李慧芬,何锬洁,王兴智,等.玉米优良自交系愈伤组织基因枪转化的研究[J].遗传学报,1999,26(4):397-402 .
[11] 张莉萍,荣廷昭,朱 祯,等.转基因玉米减少无性变异、提高成活率的研究[J].四川农业大学学报,2000,18(3):23 .