

文章编号: 1005-0906(2004)03-0033-03

玉米愈伤组织的遗传转化和对草丁膦抗性及植株再生的研究

姚 丹,王丕武,刘占柱,郝文媛,关淑艳

(吉林农业大学生物中心,吉林 长春 130118)

摘要: 以玉米自交系 7922、P2 和 H99 的胚性愈伤组织为材料,通过愈伤组织对草丁膦的敏感性实验,确定愈伤组织适宜选择压,并探讨了不同激素对愈伤组织分化的影响,用带有质粒 PGBllloxAp.Bt.35sp.bar 的根癌农杆菌 LBA4404 转化玉米愈伤组织,PCR 检测证明,目的基因已整合到玉米基因组中。

关键词: 玉米;自交系;愈伤组织;农杆菌;遗传转化;草丁膦

中图分类号: S513.3

文献标识码: A

Maize Embryogenic Calli Transformation and Resistance to Herbicide Basta and Plant Regeneration

YAO Dan, WANG Pei-wu, LIU Zhan-zhu, HAO Wen-yuan, GUAN Shu-yan

(The Living Beings Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The embryogenic callus of inbred 7922, P2 and H99 were selected on MS medium containing different concentration of PPT, after 30 days the result of tissue culture indicated that 6 mg/L PPT was the most suitable selected concentration;and in this study we found that maize callus were more suitable to regeneration plant on MS medium containing 6-BA 1 mg/L and KT 2 mg/L. Bt gene was successfully transferred into callus through *agrobacterium tumefaciens* LBA4404(PACT). The analysis of PCR demonstrated that the extrogenous gene had integrated into the maize genome.

Key words: Maize; Inbred; Embryogenic calli; *Agrobacterium tumefaciens*; Transformation; Basta

除草剂草丁膦 (Basta) 的有效成分 phosphinothricin(PPT)是 L-谷氨酸的结构类似物,在植物细胞内与 L-谷氨酸竞争谷氨酰胺合成酶(GS),导致 NH_4 无法与 L-谷氨酸结合形成谷氨酰胺,游离 NH_4 的积累最终使植物细胞的生长受到抑制或死亡^[1]。bar 基因编码 PPT 的乙酰转移酶,它的表达可使植物细胞解除 PPT 的毒性。因此 bar 基因的转化体对草丁膦有明显的抗性。近年来,bar 基因作为选择标记基因被广泛地应用于植物的遗传转化中。本实验采用农杆菌介导法将带有 bar 标记基因的 Bt 抗虫基因转入玉米自交系 7922、P2 和 H99 的胚性愈伤组织,通

过愈伤组织对草丁膦的敏感性实验,初步确定了筛选 bar 基因玉米愈伤组织的有效选择压,并探讨了不同激素对愈伤组织分化的影响。PCR 检测证明,Bt 杀虫蛋白基因已整合到再生玉米植株中。

1 材料与方法

1.1 植物材料

玉米自交系:7922、H99 和 P2。

外植体:取授粉 10~14 d 的雌幼穗,无菌条件下挑取 1.0~2.0 mm 的未成熟胚,盾片朝上接种于诱导培养基上,26℃暗培养 3~4 周产生 I 型初始愈伤组织,每隔 20 d 继代 1 次,继代 1~2 次后即产生稳定的 II 型愈伤组织,取继代 2~3 次的 II 型愈伤组织作为农杆菌转化的受体材料。

1.2 质粒和菌株

农杆菌菌株:根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404。

收稿日期: 2003-08-13

基金项目:“国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题(J99-B-001)

作者简介:姚 丹(1977-),女,吉林农业大学生物中心,硕士,从事玉米遗传转化的研究。

王丕武为本文通讯作者。Tel:13504707435

质粒:PGBIloxAP.Bt.35sp.bar 由中国农科院生物技术中心构建,该质粒 T-DNA 区包含新霉素磷酸转移酶基因(nptII)、PPT 乙酰转移酶基因(bar)和苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因(Bt)。

1.3 培养基

愈伤组织诱导培养基:MS 改良培养基 + 2,4-D 2 mg/L。

愈伤组织继代培养基:MS 改良培养基 + 2,4-D 1 mg/L。

选择继代培养基:MS 改良培养基 + 头孢霉素 250 mg/L + 羧苄青霉素 200 mg/L + PPT 1 ~ 6 mg/L。

分化培养基:MS 改良培养基 + 6-BA 1 mg/L + KT 2 mg/L。

生根培养基:1/2 MS 改良培养基 + NAA 1 mg/L + 活性炭 0.5 mg/L。上述培养基中均附加蔗糖 3%,琼脂粉 0.8%,pH5.8。

1.4 愈伤组织选择压的确定

将胚性愈伤组织转移到分别加有 0,1,2,4,6,8,10,12,16 和 20 mg/L Basta 除草剂的筛选继代培养基上,1 个月后观察愈伤组织褐变及增重情况,统计愈伤组织存活率。再将存活的愈伤组织继续转入分化培养基,1 个月后统计愈伤组织分化率,根据愈伤组织存活率和分化率,确定愈伤组织最适宜的选择压。

1.5 不同激素对愈伤组织再生分化的研究

本实验在以 MS 改良培养基为分化基本培养基的基础上,以 6-BA、IBA、KT 三种外源激素设置不同组合,30 d 后统计愈伤组织在不同外源激素组合分化培养基上的出苗率,确定不同激素对玉米愈伤组织再生分化的影响。

1.6 农杆菌转化

从新鲜平板中挑取农杆菌 LBA4404 单菌落,接种于含有 50 mg/L kmYEB 液体培养基中,28℃,200 r/min 振荡培养至对数生长期 OD600 值达到 0.5 左右^[2]。菌液在 3 500 ~ 4 000 r/min、4℃下离心 10 min,收集菌体,再将农杆菌重新悬浮于感染培养基中至 OD600 值在 0.4 左右备用。将继代 2 ~ 3 次的 II 型愈伤组织放入 50 mL 重悬后的菌液中浸泡 25 ~ 30 min,每隔 5 min 振荡一次,倒掉菌液,将外植体放入铺有无菌滤纸的培养皿中,吸干愈伤组织表面多余的菌液,然后转入共培养培养基(附加 200 μg/L As)中,28℃黑暗条件下共培养 3 d。用无菌水漂洗愈伤组织表面的农杆菌,转接于含有适宜 PPT 的杀菌筛选培养基,3 周后在相同培养基上继代 1 次,再在去

掉头孢霉素和羧苄青霉素的培养基上继代 1 次,筛选 3 次后的愈伤组织转至分化培养基,分化出的苗转入生根培养基^[3]。

1.7 PCR 检测

取抗性植株的叶片按照 CTAB^[4]方法提取植物基因组 DNA。PCR 检测:引物 P1 5'-CCATACAA CTGCTTGAGTAACCCAGAAGTTG-3',引物 P2 5'-GGGCCCCGCTGAATCCAACCTGGAGAGGC-3',反应体积 25 μL。扩增反应参数:94℃变性 4 min,94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,32 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物于 1.0%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外透射仪分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织筛选压的确定

将 H99 的胚性愈伤组织转接于不同浓度的含 PPT 的筛选继代培养基上,1 个月后观察愈伤组织褐变及增重情况,统计结果见表 1 和表 2。

表 1 H99 愈伤组织对 Basta 除草剂的敏感性

PPT 浓度 (mg/L)	愈伤组织块数(块)	褐变愈伤组织块数(块)	褐变率 (%)	出苗数 (株)	出苗率 (%)
0	75	3	4.0	34	45.3
1	75	17	22.7	20	26.7
2	75	33	44.0	11	14.7
4	75	51	68.0	13	17.3
6	75	45	60.0	3	4.0
8	75	59	78.7	1	1.3
10	75	71	94.7	0	0.0
12	75	75	100.0	0	0.0
16	75	75	100.0	0	0.0
20	75	75	100.0	0	0.0

表 2 Basta 除草剂浓度对玉米愈伤组织重量增长的影响

Basta 浓度 (mg/L)	初始愈伤质量(g)	继代培养后愈伤质量(g)	增重指数
0	0.538 1	4.391 8	7.16
1	0.623 1	2.872 5	3.61
2	0.567 2	1.468 0	1.59
4	0.598 8	1.106 4	0.85
6	0.523 1	1.161 7	1.22
8	0.807 7	1.452 9	0.80
10	0.787 4	1.392 4	0.77
12	0.697 3	1.119 6	0.61
16	0.637 4	0.968 7	0.52
20	0.587 4	0.932 1	0.59

试验结果表明,在加有 Basta 除草剂的培养基上,未转化的愈伤组织生长速率明显下降,随着除草剂浓度的升高,愈伤组织褐变率也相应增高,并且大多数愈伤组织直接变褐死亡,存活愈伤组织生长缓慢,部分丧失胚性。由表 1 可确定,Basta 除草剂浓度

为 10 mg/L 时,褐变死亡率为 94.7%,是较为合适的筛选浓度。但由于 PPT 浓度高于 6 mg/L 时对玉米愈伤组织的分化具有明显的抑制作用,所以该实验确定 PPT 筛选浓度为 1 mg/L、3 mg/L、6 mg/L 的梯度筛选。试验中还发现,不同生理状态下的愈伤组织,对 Basta 除草剂的敏感性也不同,生长状态较好

时,耐受性较强,反之较弱。

2.2 不同激素对玉米愈伤组织再生分化的研究

将 P2 的胚性愈伤组织分别接种于含有 6-BA、IBA、KT 三种不同外源激素组合的分化培养基上,在 30 d 后统计愈伤组织出苗率(表 3)。

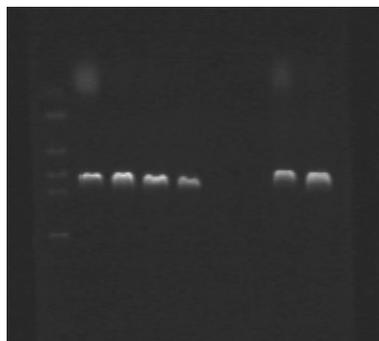
表 3 不同激素组合对玉米愈伤组织再生分化的影响

激素组合	愈伤组织块数 (块)	愈伤组织出苗数 (株)	愈伤组织出苗率 (%)
① MS + 6-BA 1 mg/L	60	22	36.7
② MS + 6-BA 1 mg/L + IBA 0.4 mg/L	60	20	33.3
③ MS + 6-BA 1 mg/L + KT 1 mg/L	60	15	25.0
④ MS + 6-BA 1 mg/L + KT 2 mg/L	60	32	53.3
⑤ MS + IBA 0.5 mg/L	60	4	6.7
⑥ MS + IBA 1 mg/L	60	4	6.7
⑦ MS + KT 1 mg/L	60	18	30.0
⑧ MS + KT 2 mg/L	60	10	16.7
⑨ MS + IBA 0.5 mg/L + KT 1 mg/L	60	27	45.0

实验结果表明,在组合④的分化培养基中出苗率最高,且苗较壮,生根培养时根系较好,易成活;组合①、②、⑦、⑨的分化出苗率也较高,但多为丛生苗,继代培养时根系生长较差,不易成活;组合⑤、⑥中仅添加 IBA 时,发现愈伤组织不易变绿,且分化率极低。

2.3 抗性植株的 PCR 检测

A B C D E F G H I



A 为 DL2000DNA 分子量标记;B 为阳性质粒;C~E 为转基因植株;
F~G 为非转基因植株对照;H~I 为转基因植株

图 1 转化植株的 PCR 检测

以 CTAB 法提取的再生植株叶片总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳分析结果表明,各转基因植株间的 PCR 产物电泳条带强度有一定差异,但所有转基因植株均能扩增出一条约 900 bp 的特异带,与阳性质粒作模板 PCR 扩增带大小相同,而非转基因的对照植株则无此特异带,初步证明 Bt 杀虫蛋白基因已整合进再生玉米植株中。目前已检测转基因植株 119 株,其中 PCR 阳性植株为 7

株,PCR 转化率为 5.9%(图 1)。

3 讨论

本研究中,通过统计 H99 胚性愈伤组织在不同浓度的含 PPT 的筛选培养基上褐变及增重情况,确定 PPT 浓度为 1 mg/L、3 mg/L、6 mg/L 的梯度筛选为适宜的筛选浓度。同时实验还探讨了不同激素对愈伤组织再生分化的影响,结果表明,MS + 6-BA 1 mg/L + KT 2 mg/L 的分化培养基中愈伤组织出苗率最高,且苗较壮,生根培养时根系较好,易成活。实验中成功获得了玉米自交系 7922、P2 和 H99 的抗性愈伤组织,并获得了再生植株。PCR 检测初步证明 Bt 杀虫蛋白基因已整合到玉米植株中。但是,由于玉米遗传转化受基因型影响较大,本实验仅针对以上 3 种基因型进行研究,对于其它玉米自交系的转化还需进一步的探索。另外,由于实验中没有得到 R₁ 代种子,因此,没有进一步研究 Bt 基因的遗传规律和后代植株的转基因拷贝数。

参考文献:

- [1] 赵天永,王国英,黄忠,等.玉米愈伤组织对草丁膦的抗性及其氨基酸的影响[J].植物学报,1998,40(11):2-11.
- [2] 张荣,王国英,张晓红,等.根瘤农杆菌介导的玉米遗传转化体系的建立[J].农业生物技术学报,2001,9(1):45-48.
- [3] 黄璐,卫志明.农杆菌介导的玉米遗传转化[J].实验生物学报,1999,32(4):381-387.
- [4] Soyle J J, Doyle J L, Hortorium B H. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1996, 12 (1): 13.