

文章编号: 1005-0906(2005)04-0024-03

基因枪介导超甜玉米幼胚转化研究

胡建广^{1,2}, 李余良^{1,2}, 祁喜涛¹, 刘建华²

(1.广东省遗传改良重点实验室, 广州 510640; 2.广东省农业科学院作物研究所, 广州 510640)

摘要: 以超甜玉米自交系 S1 及其杂交种粤甜 3 号的幼胚为材料, 通过优化基因枪转化条件, 获得 18 个可育的转基因超甜玉米株系。研究结果显示, 金粉直径、氦气压力和轰击距离等均影响基因枪的转化效率, 用 1.0 μL 金粉, 轰击距离为 12 cm, 压力为 1 100 Pa 时, 转化效率最高。

关键词: 超甜玉米; 基因枪; 幼胚; 转基因

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Gene Gun Mediated Transformation in Super Sweet Maize Inbreeding Line

HU Jian-guang^{1,2}, LI Yu-liang^{1,2}, QI Xi-tao¹, LIU Jian-hua²

(1. The Key Laboratory of Guangdong Province for Crops Genetic Improvement, Guangzhou 510640;

2. Institute of Crop Sciences, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Using super sweet corn inbreeding lines S1, its hybrid Yuetian No.3 as materials, from optimizing the parameters of gene gun transformation, 18 transgenic fertile plant lines were obtained. The research showed that the diameter of golden particle, bombardment distance, and helium pressure all influence the frequency of gene gun transformation, 1.0 μL of golden particle, 12 cm of bombardment distance, and 1 100 ps of helium pressure were more fit for super sweet corn in gene gun transformation.

Key words: Super sweet corn; Gene gun; Immature embryo; Genetic transformation

玉米是世界上第三大粮食作物, 利用基因工程对其实施基因改良具有重要意义。玉米生产上主要使用杂交种, 因此建立玉米自交系的高效再生实验条件和转基因方法, 可以显著缩短基因工程育种年限。

超甜玉米是果蔬类特用玉米, 营养价值十分丰富, 主要在我国东南地区种植, 面积超过 20 万 hm^2 , 并且每年以 30% 的速度快速增长。有关超甜玉米自交系幼胚基因枪转基因研究还未见详细报道。本实验以我们在生产中大面积推广的超甜玉米品种及其亲本为材料, 在建立了超甜玉米自交系 S1 及其杂交种幼胚高效诱导愈伤组织和再生系统的基础上, 优化了基因枪转化条件, 通过基因枪直接转化幼胚的方法, 获得了可育的转基因甜玉米株系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试玉米品种: 自交系 S1 和杂交种粤甜 3 号。

外植体: 取授粉 9~11 d 的果穗, 幼胚长度为 1~2 mm, 苞叶外用 70% 的酒精表面消毒, 再用 20% 次氯酸钠浸泡消毒 20 min, 无菌水冲洗 3 次, 在无菌条件下, 用解剖镊子直接挑取幼胚。

1.2 培养基

诱导培养基(IM): N_6 大量元素、微量元素+ B_5 维生素+谷氨酰胺 300 mg/L+水解酪蛋白 500 mg/L+脯氨酸 700 mg/L+蔗糖 20 g/L+2,4-D 2 mg/L+ AgNO_3 900 mg/L; 继代培养基: IM+ABA 3.0 mg/L; 分化培养基: MS 大量元素、微量元素+ B_5 维生素+谷氨酰胺 300 mg/L+水解酪蛋白 500 mg/L+蔗糖 20 g/L+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 生根培养基: 1/2 MS+蔗糖 10 g/L+IBA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

1.3 质粒载体构建

本研究所用载体分别为 pAct1-D 和 pGLB-anti-FBPK, 其中 pAct1-D 质粒载体由美国康乃尔大学的

收稿日期: 2004-11-29

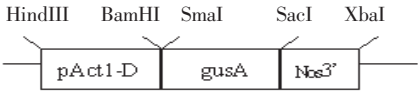
基金项目: 国家自然科学基金(30070459)、广东省自然科学基金(031988, 04002100)

作者简介: 胡建广(1963-), 博士, 研究员, 广东省甜玉米重大攻关项目协调人。Tel: 020-85514234 1382516744

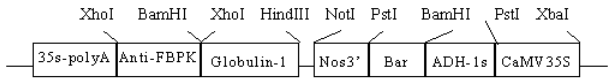
E-mail: hjguang@yahoo.com

吴瑞实验室构建,含有 *gusA* 基因,pGLB-anti-FBPK 载体由本研究室构建。它们的物理图谱分别为:

pAct1-D:



pGLB-anti-FBPK:



1.4 基因枪转化

选取授粉后 8~10 d、长度在 1~2 mm 的幼胚,在轰击前 4~5 h 转移到高渗培养基(继代培养基附加 0.4 mol/L 甘露醇或山梨醇)上培养。按照 Klen 等的方法制备金粉(直径 1.0 μm 或 1.6 μm,Bio-Rad)悬浮液,将质粒包裹在金粉微载体后,用 Bio-Rad PDS-1000/He 基因枪轰击经高渗处理的愈伤组织。样品真空度 25 mMPa,可裂膜压力分别 900、1 100 和 1 350 Pa,靶细胞与微载体距离为 6、9 或 12 cm。轰击 16 h 后将幼胚转移到继代培养基上恢复生长 3 d。

1.5 GUS 的组织化学染色

将基因枪轰击的幼胚,在 0.3%的甲醛溶液中固定 1 h(室温),然后在 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)中冲洗 3 次,转入染色液(X-Glu,浓度 1 mg/mL)于 37℃下染色 2~16 h,在显微镜下观察幼胚上绿点的分布与数量,拍照。

1.6 抗性愈伤组织的筛选和植株再生

将恢复生长的幼胚转移到附加 5 mg/L Basta 的选择培养基上筛选 4~5 周,然后转移到 10 mg/L Basta 的选择培养基上继续筛选,每次继代均选择生长良好的愈伤组织转入下一轮,经过 3 轮筛选后,抗性愈伤组织经 ABA 培养基诱导胚状体形成,3 周后转入再生培养基诱导小苗。培养条件为:温度 26~28℃,光照 16 h/d,光强 1 500~2 000 lx,愈伤组织先长出绿点,再长成小苗,将分化的小苗转移到生根培养基中生根,经练苗后移栽花盆中,然后移栽温室。

1.7 转化体的分子检测

转基因植物在温室长至 8 片叶以后,剪取 3~5 g 新鲜叶片,用 STAB 法提取 DNA,用于 PCR 检测。根据 *Bar* 基因序列设计的引物为:引物 1:5'-AT-GAGCCCAGAACGACGC-3',引物 2:5'-GAT AGA CTC GTG CGG CAG-3'。反应体系:总体积 50 μL,其中 DNA 模板 0.05 μg,两种引物各 0.5 μmol/L,dNTP 各 0.25 mmol/L,Taq 酶 1 U。扩增程序:95℃ 5 min,然后依次为 94℃ 1 min,63℃ 1 min,72℃ 1 min 30 s,循环 35 次,最后在 72℃保温 5 min。取样 15 μL 在 1.2%的琼脂糖凝胶上进行电泳(1×TAE)。PCR 产物电泳后,电转膜。*Bar* 基因从质粒 pGLB-anti-FBPK 中用 PstI 和 BamHI 双酶切,回收 570 bp 的 *Bar* 基因 DNA 片段,利用地高辛进行引物标记(ROCHE 公司),参照试剂盒说明进行分子杂交。

2 研究结果

2.1 基因枪转化条件优化

以 pAct1-D 质粒为转化载体,依据金粉的直径、氦气压力和轰击距离 3 个因素,设计了 6 组不同的基因枪转化的实验条件(表 1)。实验结果表明,在单因子中,金粉直径为 1.0 μm 和 1.6 μm 的 GUS 瞬间表达率分别为 67.9%和 64.9%,转化效率比较接近,均获得比较满意的结果。轰击时选择压力分别为 900、1 100 和 1 350 Pa。以 1 100 Pa 为最佳,转化率最高为 67.9%;其次为 900 Pa,转化率为 61.5%,压力增加到 1 350 Pa 时,转化率降低为 58.9%。轰击距离与金粉散面和冲击力相关,本实验共比较 6、9 和 12 cm 这 3 个距离的转化效率。在轰击压力为 1 100 Pa,金粉直径为 1.0 μm 时,转化效率分别为 45.6%、67.9%和 37.7%,说明轰击距离的差异对转化效率影响较大。质粒 DNA 用量对转化也有一定影响,因 DNA 浓度过高,金粉容易结块,不易均匀散开,过低则外源基因进入细胞的机会较少,影响转化频率。每 50 μL 金粉,加入 15 μg 的 DNA 可以取得较好效果,综合以上 3 个因素,以金粉直径 1.0 μm、轰击压力 1 100 Pa 和 DNA 量 15 μg/50 μL 金粉时,效果最好(图 1)。

表 1 金粉直径、轰击距离和氦气压力对基因枪转化效率的影响

序 号	金粉直径(μm)	氦气压力(Pa)	轰击距离(cm)	幼胚数	GUS 表达幼胚数	频率(%)
1	1.0	1 100	9	53	36	67.9
2	1.6	1 100	9	57	37	64.9
3	1.0	1 100	6	46	21	45.6
4	1.0	1 100	12	53	20	37.7
5	1.0	900	9	52	32	61.5
6	1.0	1 350	9	56	33	58.9

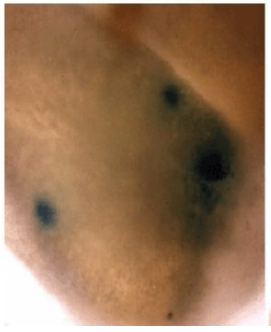
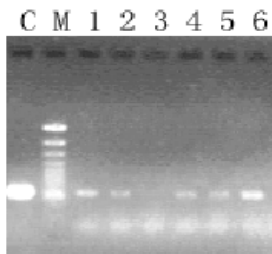


图1 *gusA* 基因在玉米幼胚中的瞬间表达

2.2 抗性愈伤组织的筛选和植株再生

用基因枪将质粒 pGLB-anti-FBPK 转化超甜玉米幼胚,经过3轮筛选,其中第1轮于25℃条件下暗培养3周,然后继代2次,每次2~3周。在筛选和继代过程中,大多数愈伤组织呈水浸状,然后褐化和死亡。只有少数愈伤组织经过7~9周的筛选,可以继续分裂,经诱导再生植株。由于玉米胚性愈伤组织不断向非胚性化转换,有一部分转化的愈伤组织失去了再生能力,所以,随着继代时间的延长,转化频率越来越低。本研究所采用的质粒较大,共转化6批次,轰击愈伤组织共计353个幼胚,再生苗18个株系,成苗率为5.1%左右。再生植株移栽大田后可以正常发育,但也有些植株发育出现异常,包括顶端出现雌穗、雌雄花期不遇等,可以通过与其他植株杂交,其后代的表现恢复正常。

2.3 转化植株的 PCR 检测与 PCR-Southern



C 为质粒, M 为 DNA 分子量, 1~6 为转基因株系

图2 转基因超甜玉米植株的 PCR 及 Southern 结果

因质粒 pGLB-anti-FBPK 的 FBPK(6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶) 基因为从玉米中克隆,不易作检测的探针,筛选标记基因 *Bar* 与该基因为同一载体,紧密连锁,所以,用 *Bar* 作探针进行转基因植物的分子检测。根据 *Bar* 基因的序列设计合成引物,对再生植株样品 DNA 进行特异性扩增,以质粒为正对照,未转化植株 DNA 为负对照。电泳结果显示,7 株转基因植株中有 5 个扩增出与质粒大小相同的条带。为了进一步验证 PCR 扩增的产物是否为 *Bar* 基因片段,排除假阳性。将 PCR 产物电泳转膜后进行 Southern 杂交,以质粒 *Bar* 基因的回收

片段为探针。杂交结果与扩增后直接照相结果完全一致(图2)。

3 讨 论

愈伤组织经转基因处理后需要经过至少3轮筛选,时间为8~12周,经过长时间继代后,愈伤组织的再分化能力明显下降,对转基因效率的提高具有重要的影响。本实验采用幼胚作为基因枪转化的受体材料,并成功获得转化植株。与愈伤组织作为转基因手段相比,利用该转基因程序,虽然转基因筛选的时间没有缩短,但省去了从幼胚诱导形成愈伤组织的时间,愈伤组织的继代时间至少减少一次,不仅缩短了实验的周期,而且也减少了因愈伤组织继代次数过多对再分化能力的影响。

6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因在玉米未成熟种子中存在大量表达,说明该基因可能同样控制未成熟种子中淀粉的积累。本研究将6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶双功能酶基因与玉米种子特异表达启动子 Globulin 反向连接,通过降低转基因植株种子中该基因的表达,研究6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因与种子淀粉积累的关系。对转化反义基因的转基因纯系乳熟期子粒的果糖-2,6-二磷酸含量测定表明,6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因在甜玉米子粒的表达被抑制,可以比较明显的影响子粒中果糖-2,6-二磷酸含量,并且反过来影响子粒中蔗糖含量,但变化幅度明显小于果糖-2,6-二磷酸含量的变化幅度。

参考文献:

- [1] 胡建广,李余良,方志伟,等. 超甜玉米自交系幼胚高效成株系统的建立[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 73-78.
- [2] McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 1990, 2: 163-177.
- [3] Klei T M, Kornstein L, Sanford J C. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol.*, 1989, 91: 440-444.
- [4] Wang D, Du X L, Hu J G. Cloning and expression on maize fructose-6-phosphate, 2-linase/ fructose-2,6-biphosphatase. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(2): 163-168.
- [5] Stitt M. Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Boil.*, 1990, 41: 153-185.
- [6] Scott P, Kruger J N. Influence of elevated fructose-2,6-bisphosphate levels on starch mobilization in transgenic tobacco leaves in the dark. *Plant Physiol.*, 1995, 108: 1569-1577.
- [7] 王秀丽,李广存,徐平丽,等. 禾本科作物基因枪介导遗传转化研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(6).