



刘悦,王立达,兰英,等. Hi-Ⅱ玉米的 *NGc* 抗虫基因遗传转化研究[J]. 黑龙江农业科学, 2022(1):1-5.

Hi-Ⅱ玉米的 *NGc* 抗虫基因遗传转化研究

刘悦,王立达,兰英,李青超,刘洋,郑旭,赵秀梅

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:为促进转基因抗虫玉米研究,通过农杆菌介导的玉米幼胚遗传转化法将目的基因转入玉米材料 Hi-Ⅱ中,通过外植体侵染、共培养以及分化筛选,培养具有 *CryNGc* 抗虫基因的玉米植株,并研究外源基因在后代的遗传表达及抗性情况。结果表明:玉米幼胚大小在 1.2~1.8 mm 时侵染效果最好,并成功获得了 10 株具有 *CryNGc* 抗虫基因的阳性转化植株,转化效率为 1.428%。

关键词:玉米;抗虫基因 *CryNGc*;遗传转化;PCR

玉米是我国第二大粮食作物,是增值作用最高的作物之一^[1-3]。为实现粮食安全和生态安全、提高农业生产效益的战略目标,提高玉米品种的科技含量是具有现实意义的重要举措之一^[4]。玉米螟俗称玉米钻心虫、钻茎虫,是玉米、谷子、高粱等粮食作物的重要害虫,因玉米螟的危害,每年损失的玉米就达 600 万~900 万 t,一般年份玉米受玉米螟危害减产 10%~15%,大发生年减产可达 30%以上,甚至绝收,严重影响玉米的产量和质量^[5]。玉米螟除直接危害玉米造成严重损失外,其危害造成的伤口又是玉米穗腐病病原菌入侵的途径,害虫本身常携带病原菌,从而诱发和加重玉米穗腐病的发生^[6]。玉米一旦发生穗腐病,籽粒中就会产生大量的真菌毒素,使玉米的品质下降。研究发现,玉米穗腐病的发病率与害虫危害呈现密切联系^[7]。

我国玉米螟的防治技术有了很大的发展,在一定程度上减少了玉米螟的危害。但由于玉米螟防治存在诸多困难,因而实际进行防治的面积为 20%~30%,且由于农民对各种技术使用掌握程度不同,防治效果也不相同^[8]。本研究通过结构域交换的方法构建了新型抗虫基因 *CryNGc*,其中包括 *Cry1Ab* 的结构域 I 和结构域 II 以及 *Cry1Gc* 的结构域 III。利用新型抗虫基因 *CryNGc* 构建植物表达载体后通过农杆菌介导法转到玉米材料 Hi-Ⅱ中,获得转基因阳性植株,旨在为转基

因抗虫玉米的研究提供新材料,同时也为转基因抗虫玉米工作的开展提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

植物表达载体 pCAMBIA3301,试验菌株农杆菌 EHA105,均由黑龙江省农业科学院提供。

以授粉后 9~12 d 的高再生能力的 Hi-Ⅱ玉米幼胚为转基因材料,用 75% 的酒精消毒,在超净工作台上取大小 1.2~1.8 mm 的幼胚,供侵染用。

1.2 方法

1.2.1 培养基的配置 YEP 培养基:5 g·L⁻¹ 酵母提取物 + 10 g·L⁻¹ 蛋白胨 + 5 g·L⁻¹ 氯化钠 + 15 g·L⁻¹ 琼脂, pH6.8。

侵染培养基:4 g·L⁻¹ N6 基础盐 + 4 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸 + 68.4 g·L⁻¹ 蔗糖 + 36 g·L⁻¹ 葡萄糖, pH5.2。

共培养培养基:4 g·L⁻¹ N6 基础盐 + 4 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸 + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.9~6.1, 高温灭菌后加入 1 mg·L⁻¹ AS + 1 mg·L⁻¹ N6 维生素 + 0.1 mg·L⁻¹ 硝酸银, pH5.8。

恢复培养基:4 g·L⁻¹ N6 基础盐 + 4 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸 + 0.5 g·L⁻¹ MES + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.9~6.1, 高温高压灭菌后加入 1 mg·L⁻¹ N6 维生素 + 1 mg·L⁻¹ Cef, pH5.8。

选择培养基 I:4 g·L⁻¹ N6 基础盐 + 4 mg·L⁻¹ 2,4-D + 0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸 + 0.5 g·L⁻¹ MES + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 8 g·L⁻¹ 琼脂, pH5.9~6.1, 灭菌后加入 1 mg·L⁻¹ N6 维生素 + 1 mg·L⁻¹ Cef + 0.5 mg·L⁻¹

收稿日期:2021-10-28

基金项目:中国科学院战略性先导科技专项(XDA28130504);黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”专项(HNK 2019CX14)。

第一作者:刘悦(1995—),女,硕士,研究实习员,从事植物保护研究。E-mail:2563522180@qq.com。

双丙氨膦+0.1 mg·L⁻¹硝酸银,pH5.8。

选择培养基Ⅱ:4 g·L⁻¹ N6 基础盐+4 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.7 g·L⁻¹ 脯氨酸+0.5 g·L⁻¹ MES+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂,pH5.9~6.1,灭菌后加入1 mg·L⁻¹ N6 维生素+1 mg·L⁻¹ Cef+0.5 mg·L⁻¹ 双丙氨膦+0.1 mg·L⁻¹ 硝酸银,pH5.8。

GF 培养基:4.3 g·L⁻¹ MS 基础盐+0.1 mg·L⁻¹ 肌醇+60 g·L⁻¹ 蔗糖+3 g·L⁻¹ 植物凝胶,pH5.9~6.1,灭菌后加入1 mg·L⁻¹ MS 维生素+1 mg·L⁻¹ Cef+1 mg·L⁻¹ 双丙氨膦。

生根壮苗培养基:4.3 g·L⁻¹ MS 基础盐+0.1 mg·L⁻¹ 肌醇+60 g·L⁻¹ 蔗糖+3 g·L⁻¹ 植物凝胶,pH5.9~6.1,灭菌后加入1 mg·L⁻¹ MS 维生素,pH5.8。

1.2.2 植物表达载体的构建 根据 *CryNGc* 基因设计引物扩增得到 *NGc* 片断和植物表达的载体分别经 *Sma* I 及 *Sac* I 双酶切,把凝胶回收后的 *NGc* 片断和植物载体的片断进行连接反应,把接连好的液体转化到大肠杆菌中的感受态细胞,卡那霉素实施抗性筛选后取目标单克隆进行 PCR,酶切和测序。碱裂解法将重组质粒转移进入 EHA105 感受态细胞中。

采用碱裂解法提取农杆菌的质粒载体:在对应的抗性 YEP 液体培养基中培养 24~48 h。取菌液 1.5~5.0 mL,4 ℃ 离心,12 000 r·min⁻¹,5 min,收集菌体。预冷溶液 I 后倒入 100 μL,吸吹混和匀称,室内温度下放置 10 min。倒入 200 μL 溶液 II,颠倒 5 次,冰上冷却 5 min。加冷溶液 III 为 150 μL,产生白色絮状物,4 ℃ 离心,12 000 r·min⁻¹,5 min。取上清倒入与上清液相同容积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀后至 4 ℃ 离心,12 000 r·min⁻¹,5 min。取上清后倒入与上清相同容积的氯仿/异戊醇(24:1),混匀后 4 ℃ 离心,12 000 r·min⁻¹,5 min。分离上清液,加取上清 2 倍体积的无水酒精(预冷),匀称混匀后-20 ℃ 静置 30 min,4 ℃ 离心,1 200 r·min⁻¹,10 min。弃上清液,倒入 70% 的酒精 1 mL,摇起沉淀后进行洗濯,12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min。弃上清液,加入 20 μL 灭菌后的超纯水溶解,于-20 ℃ 下保存。

PCR 的反应系统如下:2×EasyTaqPCRSuperMix 10 μL,引物各 0.3 μL,模板 1 μL,ddH₂O 8.4 μL,总体系共 2 μL。

反应程序如下:预变性 95 ℃,5 min。变性

95 ℃,30 s。退火 58 ℃,45 s。延伸 72 ℃,1 min。反复轮回 30 次。延迟 72 ℃,10 min。

DNA 的限制酶切反应:使用 *Sma* I 及 *Sac* I 对重组后的质粒双酶切,酶切系统为 20 μL 体系,其中 PCR 产品 8 μL,酶切缓冲液 2 μL,限制性内切酶各 1 μL,37 ℃ 酶切 1~2 h。

1.2.3 制备工程农杆菌 将保存于-80 ℃ 冰柜中的农杆菌于 YEP 固体培养基上进行划线培养,培育长到 1 mm 大小的单菌落,经过分子验证后重新于 YEP 固体培养基上划线培养,19 ℃ 培养 3 d 后采集菌体,悬浮至侵染培养基中,确保 OD₅₅₀ 值到达 0.3~0.4 后备用。

1.2.4 外植体的制备 取授粉 9~12 d 左右的雌蕊,剥去玉米叶,将顶端切去 1 cm 左右后浸泡在浓度为 75% 的酒精+20 μL 吐温中,放在转速 120~135 r·min⁻¹ 的摇床上,灭菌 15 min 之后,使用无菌水反复冲刷洗涤 2 次。在超净工作台上剥离幼小胚芽,幼小胚芽为 1.2~1.8 mm,放于 2 mL 垂悬液的离心管中,每管中大约包含 100~110 个幼胚。

1.2.5 外植体侵染 将离心管中的垂悬液弃尽,加入 2 mL 的垂悬液冲洗后,弃去垂悬液,加入 2 mL 的侵染液,缓慢倒置混和均匀 20 次后,室温黑暗处放置 5 min。侵染完成,弃 1 mL 农杆菌液体,将幼胚置于灭菌滤纸上。

1.2.6 共培养及恢复培养 将滤纸上的幼胚倒扣在共培养培养基上,使每一个幼胚的鼓面朝上,平面朝下,间距均匀地摆放,1 管 1 皿,20 ℃,暗培养 3 d。3 d 后将非乳白瘫软的完整幼胚转到恢复培养基上,鼓面朝上平面朝下,间距均匀,每皿 50 个左右,在 25~28 ℃ 黑暗培养 7 d。

1.2.7 半筛培养 将幼胚去芽后转移到选择培养基 I,鼓面朝上,平面朝下,间距均匀,每皿 30~35 个,温度 28 ℃,暗培养 14 d。

1.2.8 筛选培养 将全部培养物单独挑出来在筛选培养基上培养,并标好事件号,其余培养物,未诱导出玉米幼胚的弃之,诱导出愈伤组织的进行下一轮筛选培养。把大于黄豆粒大小的抗性组织与其余组织分离,其余组织弃之,抗性愈伤组织继续筛选培养,10~14 d 循环往复。

1.2.9 暗分化 将抗性具有高度分化的薄壁细胞,间距均匀且松散地分布于暗分化培养基中。25 ℃,暗培养 10~21 d,直到大部分小白产生,小白要及时挑出。

光分化:将小白挑入光分化培养基上,25℃强光照,培养至半数以上再生苗顶盖时进入壮苗生根。

壮苗生根:挑选生长强壮的再生苗进行修剪,根部的根和愈伤组织要求全部切干净,但不能伤害到根和茎。转移到生根壮苗培养基中,生根罐内放同一转化事件 3~5 棵苗,25℃,强光照,培养至分化出 3~4 条根系,即可移交温室。

1.2.10 转基因植株分子检测 根据 *CryNGc* 序列设计特异引物,挑选的退火温度为 62℃, *NGc* 基因的获得→农杆菌的活化与继代,此时带有目的基因 *NGc*→玉米幼穗的取材→幼穗的消毒→悬浮液和侵染液的制备→剥取幼胚→侵染与共培养(A 培养基)→3 d 后恢复培养(H 培养基)→7 d 后半筛培养(NS1 培养基)→14 d 后筛选培养(NS2 培养基)→14 d 后连续筛选培养(NS2 培养基)→14 d 后暗分化(F 培养基)→21 d 后光分化(GF 培养基)→5~10 d 壮苗生根(R 培养基)→移至温室长出叶片→PCR 检测 *NGc* 基因是否转入玉米基因组中。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

本研究通过结构域交换的方法构建了新型抗虫基因 *CryNGc*,其中包括 *Cry1Ab* 的结构域 I 和结构域 II 以及 *Cry1Gc* 的结构域 III(图 1A)。利用新型抗虫基因 *CryNGc* 设计引物扩增得到 *NGc* 片断和植物表达的载体分别经 *Sma* I 及 *Sac* I 双酶切并连接转化后构建重组质粒。由图 1B 可知,PCR 检测获得了 1 000 bp 左右的条带,证明了重组质粒构建成功。

A

结构域 I 结构域 II 结构域 III

Cry1Ab

Cry1Gc

↓

CryNGc

B

1 2

5 000 bp

3 000 bp

2 000 bp

1 000 bp

750 bp

500 bp

250 bp

100 bp

A. *CryNGc* 结构域的交换;B. 重组载体的 PCR 扩增;
1. 5 000 bp Marker;2. 质粒。

图 1 植物表达载体的构建

2.2 外植体的大小对遗传转化的影响

幼胚的大小会直接影响遗传转化的效应。根

据外植体侵染试验的结果可以看出,当幼胚大小为 1.2~1.8 mm 时,侵染后的存活率最高,幼胚存活率可达 85%,是幼胚小于 1.2 mm 时侵染存活率的 2.36 倍,同时也是幼胚大于 1.8 mm 时侵染存活率的 1.54 倍(图 2),故后续试验中将幼胚大小取 1.2~1.8 mm。另外研究发现幼胚用 OD₅₅₀ 为 0.3~0.4 的菌液进行侵染,遗传转化效率较高。

幼胚大小/mm	侵染成活率/%
<1.2	38 (a)
1.2~1.8	85 (b)
>1.8	58 (c)

图 2 不同幼胚大小的侵染成活率

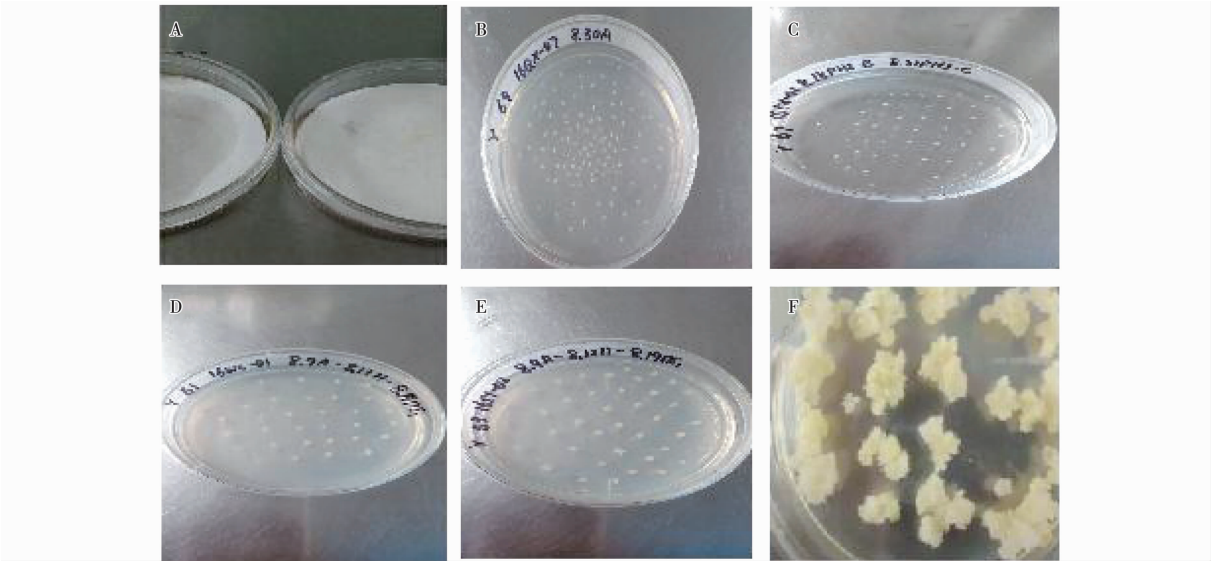
注:不同小写字母代表 0.05 水平差异显著。

2.3 玉米幼胚各阶段的生长情况

将幼胚置于垂悬液冲洗后,加入 2 mL 的侵染液,室温暗处进行外植体侵染。研究发现对幼胚的侵染时间控制在 5 min 时侵染效果最好。将侵染后的幼胚倒扣在共培养基上,鼓面朝上进行共培养,发现根瘤农杆菌只有和完整的幼小胚芽才能合营滋长,故在进行外植体制备时,应尽量保证剥离幼胚的完整性(图 3A、B)。

为促进幼胚长大,将幼胚转移至恢复培养基上进行恢复培养,然后将恢复培养的幼胚在选择培养基 I 上继续进行半筛培养。结果表明恢复培养后的幼胚存活情况和生长状态明显变好,并在半筛培养后初阶遴选出愈伤组织(图 3C、D),为加大筛选愈伤组织,去掉假阳性,将初筛的愈伤组织置于选择培养基 II 上筛选后,将抗性愈伤组织进行暗分化培养。研究发现在愈伤组织直径达 2~4 cm 时进入暗分化培养较好,抗性组织较大而该轮不进入暗分化时,可将其分解成直径 1 cm 继续筛选培养(图 3E、F)。

将暗分化培养后的抗性愈伤转移至 GF 培养基上进行光分化培养得到再生苗,挑选生长健壮的再生苗进行壮苗生根,并移至温室长出叶片。综上所述,经双丙氨膦 0.5 mg·L⁻¹ 继代筛选两轮及双丙氨膦 1.0 mg·L⁻¹ 分解筛选一轮,得到抗性愈伤,经光照培养获得转化苗。

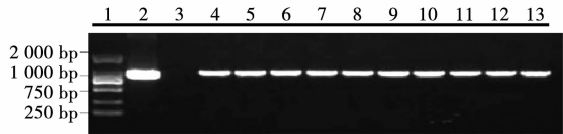


A. 将胚的凹面接触 A 培养基,鼓面朝上;B. 共培养;C. 恢复培养;D. 半筛选培养;E. 筛选培养;F. 暗分化。

图 3 剥取幼胚及继代培养时幼胚的生长情况

2.4 转基因植株的 PCR 检测

当转化苗移栽成活后,提取叶片中的 DNA 进行 PCR 检测,结果表明,一共剥取 7 000 个幼胚,已知目的基因组条带大小是 1 017 bp,有 10 株再生苗扩增出与阳性对照相同的目的片段(图 4),表明外源基因 *CryNGc* 已成功融合到玉米基因组中,转化效率为 1.428%。



1. 2 000 bp Marker;2. 阳性对照;3. 阴性对照;
4~13. 转基因再生苗。

图 4 再生苗的 PCR 检测结果

3 讨论

新型基因具有野生型 *Bt* 基因的杀虫本质,比如 *Cry1*、*Cry2* 类基因对鳞翅目害虫有杀虫活性,*Cry3*、*Cry7*、*Cry9* 类基因等对鞘翅目害虫有杀虫本质,*Cyt1*、*Cry10*、*Cry11* 类基因对双翅目害虫有杀虫性,*Cry5*、*Cry12*、*Cry14* 类基因可杀灭线虫。但野生型菌株存在一定的弊病,因此期望通过分子改造的手段获得新型基因。有研究表明转基因玉米品种 MON89034 就是转入了经过分子改造的新基因,定名为 *Cry1A. 105*,该基因是将 *Cry1Ab*、*Cry1Ac* 的结构域 II 和 *Cry1F* 的结构域 III 重组^[9-11]。本研究中同样采取 *Cry1Ab* 的结构域 I 和结构域 II 以及 *Cry1Gc* 的结构域 III。为了验证该基因是否具有抗虫性,通过 PCR 检测表明

CryNGc 基因成功融合到玉米基因组里,并在室内外进行接虫试验,结论为 *CryNGc* 基因对亚洲玉米螟有强抗性。

对 *Bt* 基因抗虫性分析中聚合酶链式反应(PCR)检测是最通常使用的检验外源目的基因是否整合到转基因植株中的方法,它操作简单,容易定性检测^[12]。所以采用 PCR 的方法检测目的基因的导入。玉米遗传转化一般选取农杆菌介导的方式,这种转化体系是应用了自然的转化载体体系,转化的发生率较大,并且转化成果较好。农杆菌介导的转化方法其转化和遴选具有简单的优点,由于它转化效率高,便捷易行而受到重视并得到广泛应用^[13]。本研究共剥取 7 000 个幼胚,获得了 10 株具有 *CryNGc* 抗虫基因的阳性转化植株,这可能由于幼胚在剥离或侵染过程中容易造成机械损伤从而使存活率降低有关,后续试验将进一步优化遗传转化条件,从而提高转化效率。

目前国际上推广应用的转基因抗虫玉米多为表达晶体蛋白等,这类蛋白质是专一性的杀死害虫的卵白,在转基因抗虫作物对地上一些节肢动物的影响研究中指出,已有转基因抗虫作物表达的 *Bt* 基因具有杀虫谱专一性,对害虫天敌没有危害和影响,并且由于栽植转基因抗虫作物,杀虫剂使用的剂量明显降低,也为有机绿色农田的大面积推广提供了科学依据^[14-16]。*CryNGc* 基因的抗虫性分析为抗虫转基因玉米的创建奠定了基础,在后续试验中将在田间对 *CryNGc* 转基因玉米进行抗虫试验研究,以期获得更丰富的 *Bt* 基因资

源,从而进一步推动抗虫转基因玉米的产业化研究。

4 结论

本研究通过结构域交换的方法构建了新型抗虫基因 *CryNGc*,然后通过根癌农杆菌介导的玉米幼小胚芽遗传转化法将目的基因转入玉米原料 Hi-Ⅱ 中。共剥取 7 000 个幼胚,转化苗的 PCR 检测呈阳性,获得了 10 株具有 *CryNGc* 抗虫基因的阳性转化植株,转化效率为 1.428‰,表明 *CryNGc* 抗虫基因已经成功整合到玉米基因组中,从而为转基因抗虫玉米的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 谢树章,雷开荣,杨小艳,等.农杆菌介导抗虫基因 *Gm-CryIF* 转化玉米的研究[J].西南农业学报,2015(3):46-50.
- [2] 李向龙,张中保,张春,等.转基因玉米试管苗移栽影响因素及移栽技术要点[J].安徽农业科学,2016,44(18):21-22.
- [3] 张彦琴,董春林,杨丽莉,等.转基因玉米的产业现状及发展对策[J].安徽农业科学,2016(30):215-216.
- [4] 李倩,王帅,隋颂扬,等.农杆菌介导的 *ZmRLK* 基因转化玉米的分析[J].分子植物育种,2017(1):150-154.
- [5] 孙越,刘秀霞,李丽莉,等.兼抗虫,除草剂,干旱转基因玉米的获得和鉴定[J].中国农业科学,2015,48(2):215-228.
- [6] 郑莹,刘家益,左璇,等.基于文献计量和内容挖掘的转基因玉米科研态势研究[J].生物技术通报,2016,32(12):

203-213.

- [7] 刘洋,刘相国,汪洋洲,等.抗虫抗除草剂转基因玉米 HiI-NGc-1 的遗传稳定性分析[J].生物技术进展,2016(6):428-434.
- [8] 王秀芹,刘希贵,曲建平,等.农杆菌介导的玉米转基因研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(18):4546-4548.
- [9] RHODES C A,PIERCE D A,METTLES I J,et al. Genetically transformed maize plants from protoplasts[J]. Science,1988,240:204-207.
- [10] ISHIDA Y,SAITO H,OHTS S,et al. High efficiency transformation of maize(*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14:745-750.
- [11] 孙传波,郭嘉,陶蕊,等.农杆菌介导玉米遗传转化体系的研究[J].中国农学通报,2012,28(36):71-75.
- [12] 邢珍娟,董立明,刘娜,等.应用直接 PCR 技术快速筛查转基因玉米方法研究[J].玉米科学,2017(1):29-33.
- [13] 王成.生物技术在玉米育种中的应用[J].农业与技术,2017,4(2):142-144.
- [14] 李宁,何康来,崔蕾,等.转基因抗虫玉米环境安全性及我国应用前景[J].植物保护,2011(6):18-26.
- [15] 吕霞,王慧,曾兴,等.转基因抗虫玉米研究及应用[J].作物杂志,2013(2):7-12.
- [16] FROMM M E,MORRISH F,ARMSTRONG C. Inheritance and expression of chimerical genes in the progeny of transgenic maize plants[J]. Bioresource Technology,2015, 8:833-839.

Study on Genetic Transformation of NGc Insect Resistant Gene in HI-Ⅱ Maize Immature Embryo

LIU Yue,WANG Li-da,LAN Ying,LI Qing-chao,LIU Yang,ZHNEG Xu,ZHAO Xiu-mei

(Qiqihar Branch,Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,Qiqihar 161006,China)

Abstract: In order to promote the research of transgenic insect resistant maize, in this study, the target gene were transferred into maize material Hi-Ⅱ by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize embryos, maize plants with *CryNGc* anti-insect genes were cultured by explant infection, co-culture and differentiation screening, and the genetic expression and resistance of exogenous genes in the offspring were studied. The results showed that at the 1.2-1.8 mm maize embryo size, the infection effect was the best, and ten positive transformed plants with *CryNGc* insect resistance genes were successfully obtained, and the transformation efficiency was 1.428‰.

Keywords: maize; insect resistant gene *CryNGc*; genetic transformation; PCR

著作权使用声明

本刊已许可中国知网、维普网、万方数据等知识服务平台以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。

黑龙江农业科学编辑部