

超声波辅助花粉介导法获得转 *BtCry1Ac* 基因玉米的研究

南芝润¹, 惠国强¹, 罗 绮¹, 宋红霞⁴, 吴家和², 孙 毅³, 张红梅¹

(1. 山西省农业科学院 玉米研究所, 山西 忻州 034000; 2. 中国科学院 微生物研究所, 北京 100101; 3. 山西省农业科学院 生物技术研究中心, 山西 太原 030031; 4. 山西大学 生物工程学院, 山西 太原 030031)

摘要: 为了进一步分析玉米基因功能及基因转化, 并为玉米抗虫提供种质资源, 利用超声波辅助花粉介导法, 将抗虫基因 *Cry1Ac* 导入玉米优良自交系昌 7-2 中, 获得大量的转基因植株。结果表明: 转基因植株经过草铵膦抗性筛选、PCR 检测、BT 蛋白试纸条检测和室内抗虫性鉴定等分析, 最后获得高抗玉米螟的转 *BtCry1Ac* 基因株系 9 个。培育出了高抗玉米螟的种质资源材料, 同时也建立了超声波辅助花粉介导转化玉米的高效转化体系, 该方法是简捷、快速有效、无基因型限制的植物转化方法。

关键词: 玉米; *Cry1Ac* 基因; 超声波处理花粉介导法; 抗虫性

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)09-0022-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0022

玉米是世界上重要的粮食和饲料作物, 也是重要的工业原料。全球对玉米的需求量正在不断攀升, 而虫害(尤其是玉米螟)已成为影响玉米产量的主要因素之一。由于缺少抗虫种质资源, 很难通过常规育种手段获得抗虫玉米品种。当前通过基因工程手段来提高作物某一特性成为现代育种研究的重要手段。转基因的植物研究对于能够有效地提高农作物产量、抗病虫害能力、抗逆性以及进行品质改良等方面具有重要意义。自 1983 年第一例转基因植物^[1]问世以来, 转基因研究得到了迅速发展。国际农业生物技术应用服务组织(International Service for The Acquisition of Agri-Biotech Applications, ISAAA)2013 年的统计数据显示, 全球共有 27 个国家合法推广种植转基因作物, 种植总面积达到了 1.75 亿 hm^2 , 比 2012 年增长了 3%(约 500 万 hm^2), 其中转基因玉米——Bt 玉米的种植面积仅在欧盟就比 2012 年增加 15%(约 1.9 万 hm^2), 达到创纪录的 14.8 万 hm^2 。2014-2015 年, 转基因棉花和转基因玉米将是主要的转基因作物。

转基因方法中的基因枪法^[2]、农杆菌介导法^[3]、电击法^[4]等已广泛应用于植物基因工程研

究中, 并取得了巨大成就。然而这些方法均存在转化周期长、基因型受限等缺点。因此科学家们一直在寻找新的转基因方法。由此非组培转化技术应运而生, 并引起人们越来越多的重视。如花粉管通道法^[5]、真空渗透法^[6]、胚型组织浸染法^[7]和农杆菌介导植物萌发种子基因转化方法^[8]等均不依赖植物细胞组织培养的转化系统, 其操作简单、转化周期短且不受物种基因型的限制等优点。然而这些方法也存在着重复性差等问题, 在转基因研究中一直不能很好地应用。

近年来, 超声波介导花粉转化法^[9]经不断摸索, 逐步发展成为新的实用性强的玉米转基因技术。该方法已在谷子^[10]、花生^[11]、油菜^[12]、苹果^[13]等物种上成功获得转基因植株。本研究采用超声波介导花粉转化方法将 *Cry1Ac* 基因导入玉米自交系材料昌 7-2, 对获得的转化后代进行草铵膦抗性筛选、PCR 鉴定和抗虫分析, 筛选高抗玉米螟的转基因株系, 为玉米抗虫育种提供种质资源。同时证明超声波介导花粉转化玉米方法是一种快速、简便的非组织培养方法, 为玉米的基因转化和基因功能分析提供了平台。

1 材料与方法

1.1 材料

转化受体材料为玉米优良自交系昌 7-2, 由山西省农业科学院玉米研究所提供。供试质粒载体 p3301-*Cry1Ac*, 由中国农业科学院王国英研究员惠赠。该质粒筛选抗性为卡那霉素, 植物筛选基因为 *bar* 基因。

收稿日期: 2015-05-08

基金项目: 国家农业部转基因专项资助项目(2008ZX08003-001)

第一作者简介: 南芝润(1979-), 女, 山西省运城市人, 硕士, 助理研究员, 从事玉米转基因育种研究。E-mail: yexue139@126.com。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 的提取 采用碱裂解法^[14]提取质粒,溶于 TE 缓冲液,用微量紫外分光光度计检测质粒浓度。将质粒浓度调节到 $250 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, A_{260}/A_{280} 值为 1.8 左右备用。

1.2.2 超声波辅助花粉介导玉米转化及再生植株的获得 将供试玉米自交系昌 7-2 在当年 4 月上、中旬播种,于 7 月上、中旬雌穗吐丝前套袋隔离。转化前 1 d 16:00-18:00 时将雄花套袋隔离,转化当天收集 10:00-12:00 点盛花期的玉米花粉,并置于 15% 蔗糖溶液中,待超声波预处理后,加入质粒 DNA,再次进行超声波处理^[15](超声波处理参数为:声强 150 W,工作时间为 6 s,间隔 5 s,工作次数 5 次)。然后将处理过的花粉涂抹于套袋隔离的玉米花丝上,并套袋挂牌标记。于当年秋后收获 T_0 种子。

1.2.3 转基因植株的草铵膦抗性筛选 把收获的转基因玉米种子播种于温室大棚。待植株生长至 4~5 叶期时,用 0.2% 的草铵膦溶液喷雾,处理 10 d 后调查植株生长情况。成活植株挂牌标记,移植大田,并套袋自交收获种子。同时在成活植株生长到 6~7 叶期时,取幼嫩叶片用于实验室 DNA 提取。

1.2.4 转化植株 DNA 的提取及 PCR 分析 采用 CTAB 法^[16]提取经过草铵膦初步筛选的 $T_1 \sim T_4$ 玉米植株鲜嫩叶片的 DNA,以此为模板进行 PCR 扩增,同时以质粒为阳性对照,非转基因植株为阴性对照。PCR 扩增抗虫基因 *Cry1Ac* 的特异引物(北京三博远志公司合成)为 F(P1): AT-CACCATCTACACCGACG; R (P2): TGAA-CAGGAAGTTGCCCTT, 扩增片段大小为 525 bp。

扩增体系为:在 20 μL 反应体系(DNA 模板 15 ng, 2 mmol dNTP 2 μL , PCR buffer 2 μL , 10 mmol 的 P1 和 P2 引物各 0.2 μL , Taq 酶 1 U, 补水至 20 μL) 中进行 PCR。扩增条件为:先于 94℃ 预变性 5 min, 然后以 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 进行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 Bt 蛋白检测试纸条分析 在玉米拔节期用取样袋每株取 2 片新鲜叶片,用 Bt-*Cry1Ac*/Ab 检测试纸条(Agdia 公司)检测 Bt 蛋白的表达情况。具体方法参照 Agdia 公司试纸条使用指南^[17]。

1.2.6 转基因植株的室内抗虫性鉴定 取蛋白

试纸条呈阳性的转基因玉米叶片(共 36 个株系),用人工孵化的玉米螟 1~2 龄幼虫进行接虫试验,在铺有湿润无菌滤纸的试管中,放置新鲜玉米叶片,每管接入 30 头玉米螟幼虫,放置 25℃ 人工气候室中,暗培养。3 次重复,每隔 2 d 换 1 次新鲜叶片,10 d 后统计不同处理玉米螟的存活率。数据用 SPSS 软件统计分析。以非转基因玉米株为对照^[18]。

2 结果与分析

在玉米盛花期利用超声波花粉介导法将抗虫基因 p3301-*Cry1Ac* 导入受体材料昌 7-2 中。共处理玉米雌穗 1 500 株,收获 T_0 种子 1 050 粒。

2.1 草铵膦抗性筛选

首先对获得的 T_0 种子及阴性对照进行草铵膦除草剂喷雾筛选。处理后的调查结果表明,阴性对照苗全部死亡;转化苗 952 株存活 82 株(见图 1),转化后的抗性苗占总转化数的 8.6%。

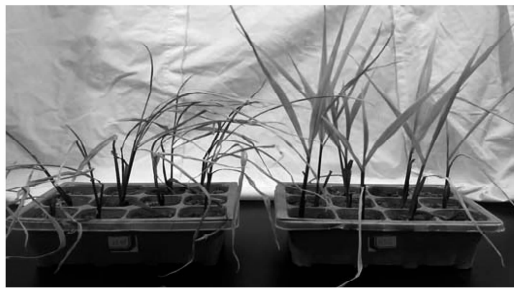


图 1 部分转基因植株的草铵膦抗性筛选
Fig. 1 Glufosinate ammonium resistant screening in transgenic maize plants(represent)

2.2 PCR 检测转化植株

对草铵膦抗性植株进行 PCR 检测,以叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增(见图 2)。结果表明,*Cry1Ac* 基因 PCR 扩增检测阳性植株为 62 株。PCR 阳性植株占转化植株总数的 6.5%(62/952)。

2.3 Bt 蛋白试纸条检测转基因玉米植株

选择 PCR 检测表现阳性的转基因植株进一步进行 Bt 蛋白表达分析。Bt 蛋白试纸条可以快速检测转基因植物是否含有 Bt 蛋白。

通过 Bt 试纸条显色反应可以判定转基因玉米植株 Bt 蛋白表达情况。结果显示仅有 58% PCR 阳性植株检测到 Bt 蛋白,且条带亮度强弱不一(见图 3)。这说明抗虫基因在不同的转基因玉米株系中表达量并不一致。可见虽然多数转基因植株中含有抗虫基因,但 Bt 蛋白是否表达以及表达水平的高低等仍然不能控制。因此对于转基因玉米的抗虫性选择是必不可少的。

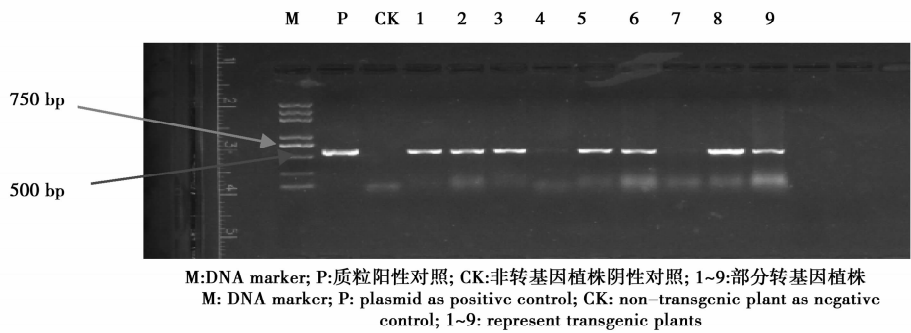


图2 转 *Cry1Ac* 基因玉米植株 T_1 的 PCR 检测
Fig.2 PCR detection for target *Cry1Ac* gene in T_1 transgenic maize plants

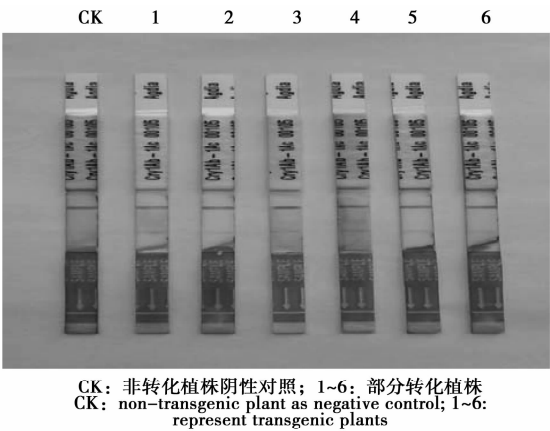


图3 部分转化植株的 Bt 蛋白试纸条检测结果
Fig.3 Detection results of represent transgenic plants by Bt protein test strip

表1 部分转 *Cry1Ac* 玉米心叶对
玉米螟幼虫的杀虫效果

Table 1 Efficacy of some transgenic *Cry1Ac* maize whorl leaves against the *Ostrinia nubilalis* larval

玉米品系 Maize variety	幼虫存活数 Larval survival number			存活率/% Survival rate
	2 d	5 d	7 d	
昌 7-2	24.67±0.6	21.64±0.30	20.67±0.57	68.9 a
BT-1	6.67±0.42	4.00±0.27	1.67±0.16	5.6 cd
BT-2	17.67±0.42	7.33±0.16	5.67±0.16	18.9 b
BT-3	17.00±0.27	9.33±0.16	3.67±0.31	12.2 b
BT-4	6.33±0.16	3.33±0.42	2.00±0.47	6.7 cd
BT-5	10.67±0.31	7.00±0.27	6.33±0.42	21.1 bc
BT-6	11.00±0.27	7.67±0.42	5.67±0.42	18.9 bc

表中数据为平均数±标准误,同列数据后不同字母表示经 LSD 测验差异显著($P<0.05$)。
Mean±SE, within a column followed by different letters mean significantly different ($P<0.05$) according to LSD test.

2.4 转基因玉米植株的室内抗虫性鉴定

1~2 龄玉米螟幼虫在取食转 *Cry1Ac* 玉米和非转基因玉米 2、5 和 7 d 后的存活数存在显著差异。随着取食时间增加,存活数减少。取食转基因玉米心叶的玉米螟幼虫 7 d 后存活率为 5.6%~21.1%,均显著低于对照 7 d 后的存活率(68.9%)。不同转基因株系之间亦存在显著差异,如取食 BT-2 和 BT-3 的存活率显著高于 BT-1 和 BT-4。而 BT-2 和 BT-3 之间,BT-5 和 BT-6 之间,BT-1 和 BT-4 之间差异均不显著。这说明转 *Cry1Ac* 玉米的心叶组织在室内条件下具有良好的杀虫效果(见表 1)。

3 结论与讨论

随着遗传转化技术的不断发展,玉米遗传转化技术也同样得到不断地改良和优化。但玉米的转基因方法依然集中在农杆菌介导法和基因枪法,离不开组织培养,受基因型限制。超声波辅助花粉介导转化法利用玉米自然授粉的过程完成转化,不需要组织培养过程,无基因型限制;因此可直接转化目前生产中正在使用的优良自交系,如本研究中的昌 7-2,无需回交,自交纯合就可直接运用在常规育种中^[19]。

外源 DNA 在植物基因组插入的位点不同,表达效果就会出现差异,从而表现出不同的抗虫性^[20]。经 PCR 等分子生物学检测获得的转基因植株,还需要经过抗虫性生物测定试验,以便观察其实际的抗虫性。本研究用经过分子生物学检测证明已转入 BT 基因株系心叶的叶片进行了抗虫性检测,结果表明幼虫取食不同株系叶片后的存活率不同。在参试的 36 个株系中,有 9 个株系的植株叶片被玉米螟幼虫取食后,存活率均在 25% 以下。

应用花粉介导法转化玉米优良自交系可获得转基因植株,*Cry1Ac* 基因导入玉米自交系可赋

予转基因植株抗玉米螟的能力。花粉介导法转化玉米是培育玉米抗病虫害品种的一条快捷、简易途径。

参考文献:

- [1] Zambryski P, Joos H, Genetello C, et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity[J]. The EMBO Journal, 1983, 2(12): 2143-2150.
- [2] Klein T M, Fromm M E, Weissinger A, et al. Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity micro projectiles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85(12): 4305-4309.
- [3] Ishide Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 745-749.
- [4] Sabin N, Pelissier B, Teissie J. Transient and stable electro transformations of intact black Mexican sweet maize cells are obtained after preplasmolysis[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(12): 924-928.
- [5] Zhou G Y, Weng J, Gong Z Z, et al. Molecular breeding of agriculture, a technique for introducing exogenous DNA in to plants after self pollination[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1988, 21(3): 12-61.
- [6] cecchine E, Gong Z H, Geri C, et al. Transgenic Arabidopsis lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit arrange of symptom-like phenotype and accumulate inclusion bodies[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 1997, 10(9): 1094-1101.
- [7] Rohini V K, Asnkara R K. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants [J]. Plant Science, 2000, 150(1): 41-49.
- [8] 孙毅, 王景雪, 刘少祥. 农杆菌介导植物萌发种子基因转化方法: 中国, ZL01104185[P]. 2001-02-26.
- [9] 孙毅, 王景雪, 崔贵梅. 超声波处理花粉介导植物基因转化方法: 中国, ZL991211529[P]. 1999-10-19.
- [10] 王节之, 郝晓芬, 郑向阳, 等. 谷子花粉介导转几丁质酶基因的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 5-6.
- [11] 梁雪莲, 郑奕雄, 庄东红, 等. 花生 *CpTI* 基因转化——花粉介导法[J]. 花生学报, 2006, 35(4): 1-5.
- [12] 杜春芳, 刘惠民, 李朋波, 等. 花粉介导法获得油菜转基因植株研究[J]. 作物学报, 2006, 32(5): 749-754.
- [13] 曹秋芬, 岳新丽, 孟玉平, 等. 超声波处理对苹果花粉介导转基因的影响[J]. 华北农学报, 2005, 20(2): 16-18.
- [14] Karl D Hauffe, Stephen P Lee, Rajagopal Subramaniam, et al. Combinatorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of 4CL1 expression in transgenic tobacco[J]. The Plant Journal, 1993, 4(2): 235-253.
- [15] 郝曜山, 孙毅, 杜建中, 等. 转双价抗虫基因 BmkIT-Chitinase 玉米株系的获得[J]. 分子植物育种, 2012, 10(2): 147-154.
- [16] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 742-744.
- [17] 王亦学, 郝曜山, 杜建中, 等. 转人工改造的 *Bt Cry1Ac* 基因中林美荷杨的获得及其抗性分析[J]. 中国农学通报, 2014, 30(28): 23-28.
- [18] 王培, 何康来, 王振营, 等. 转 *Cry1Ac* 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 395-400.
- [19] 关淑艳, 柴晓杰, 曲同宝, 等. 花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系的研究[J]. 玉米科学, 2005, 13(4): 13-15, 23.
- [20] 诸葛强, 王婕琛, 陈英, 等. 新疆杨高效遗传转化系统的建立[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 6-10.

Research on *BtCry1Ac* Transgenic Maize Lines Using Ultrasonic-assisted Pollen Mediated Plant Transformation Method

NAN Zhi-run¹, HUI Guo-qiang¹, LUO Qi¹, SONG Hong-xia⁴, WU Jia-he², SUN Yi³, ZHANG Hong-mei¹

(1. Maize Research Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Xinzhou, Shanxi 034000; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; 3. Biotechnology Research Center of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan, Shanxi 030031; 4. Biological Engineering College of Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract: In order to further analyze the gene functions and transformation of maize, and provide germplasm resources for maize insect-resistant. The insect resistant *Cry1Ac* gene was used to transfer into maize inbred lines Chang 7-2, through the method of ultrasonic-assisted pollen mediated transformation, more transgenic-maize plantlets were obtained. The results showed that the transgenic plants were detected by PCR detection, Bt protein strip and raising insect assay in laboratory. Nine elite transgenic lines with high resistance to *Ostrinia nubilalis* were developed. In conclusion, it not only provided germplasm resources for maize breeding but also established the ultrasonic processing pollen mediated maize genetic transformation method, which was a simple, rapid and effective method for the transformation of plants.

Keywords: maize (*Zea mays* L.); *Cry1Ac* gene; ultrasonic-assisted pollen mediated plant transformation method; resistance to insect