

文章编号: 1003-8701(2015)06-0034-04

# 玉米转基因受体材料的筛选研究

尚丽霞, 于志晶, 蔡勤安, 孟凡钢, 曾 军, 林秀峰\*, 马 瑞\*

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

**摘 要:** 玉米胚性愈伤组织的诱导率直接影响玉米遗传转化效率。本研究利用 N6 培养基诱导玉米幼胚产生胚性愈伤组织, 以筛选玉米转基因受体材料。从 215 个玉米基因型中筛选出 28 个胚性愈伤组织诱导率较高的材料, 其中, 6 个基因型的诱导率高于对照 A188 和 Hi-II。基因型“吉 V130”胚性愈伤组织诱导率最高, 作为受体材料进行转基因研究中, 获得了较高的转化效率。该基因型在今后玉米基因功能研究和基因工程育种中可作为重要的受体材料。

**关键词:** 玉米基因型; 胚性愈伤组织; 转基因

中图分类号: S513

文献标识码: A

## Genotype Slection for Genetic Transformation of Maize (*Zea Mays* L.)

SHANG Li-xia, YU Zhi-jing, CAI Qin-an, MENG Fan-gang, ZENG Jun, LIN Xiu-feng\*, MA Rui\*

(*Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China*)

**Abstract:** The genetic transformation rate of maize is directly affected by induction rate of embryogenic calluses. Friable embryogenic calluses were induced from immature embryos of maize on N6 induction medium and 28 genotypes with high induction efficiencies were screened from 215 maize inbred lines. The induction efficiencies of 6 genotypes were higher than that of control ‘A188’ and ‘Hi-II’. The genotype ‘JiV130’ confirmed in later experiment is the suitable genotype for genetic transformation, and can be routinely used for the production of large numbers of transgenic plants. This result will be favorable for maize breeding by genetic engineering.

**Key words:** Maize genotype; Embryogenic callus; Genetic transformation

我国是世界上第二大玉米生产国, 玉米在我国经济生产中占有非常重要的地位。长期以来, 科研工作者利用常规育种技术, 即通过有性杂交实现基因重组, 育成了大量优良品种。但是, 利用常规杂交育种技术进行玉米改良中受到很多因素的影响, 如优良亲本自交系当选率低, 自交系的培育和改造困难, 育种周期长, 特别是由于栽培品种中某些特定种质资源的缺乏, 以及远缘杂交不亲和性等障碍, 限制了物种间优良性状的转移。随着生物技术的迅速发展, 利用基因工程技术改良玉米常规育种难以改良的性状(如品质改

良、抗虫、抗病、抗旱等)变得现实可行, 并取得了传统育种技术难以达到的效果<sup>[1]</sup>, 目前, 基因工程技术已经应用于玉米优良品种选育和遗传改良中, 在某些研究方面获得了很大的进展, 并进入产业化阶段<sup>[2]</sup>。

建立稳定、简便和高效的遗传转化系统是玉米基因工程育种应用的前提条件, 良好的受体材料是遗传转化成功的关键因素。科研工作者虽然通过优化各种影响因子建立了玉米遗传转化技术体系, 但其转化效率仍然受玉米基因型的限制。目前为止, 玉米转基因研究大都仍局限于 A188 和 Hi-II 等少数几个基因型作为受体材料<sup>[3-15]</sup>, 虽然也有一些利用玉米主要自交系遗传转化研究报告<sup>[16-25]</sup>, 但转基因成功的事例较少, 主要原因是大多数生产上常用的自交系很难形成 II 型愈伤组织, 遗传转化技术体系尚未成熟, 基因型依赖性强是影响转化的主要限制因素。

随着玉米基因组学的迅速发展, 高效遗传转化技术体系将成为玉米基础研究和品种改良的关键技术之一。本研究将依据不同玉米基因型胚性

收稿日期: 2015-06-28

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20130206005NY); 农业部转基因专项(2014ZX08004-002)

作者简介: 尚丽霞(1967-), 女, 研究实习员, 主要从事作物遗传工程研究。

通讯作者: 林秀峰, 女, 硕士, 研究员, E-mail: linxiufeng8581@163.com

马 瑞, 男, 博士, 研究员, E-mail: nuimaa@126.com

愈伤组织的诱导率,筛选农艺性状较好且适宜于遗传转化的转基因受体材料,为今后玉米转基因研究和基因工程育种提供更好的受体材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 玉米材料

本研究共用“吉 V130”等 215 个玉米基因型,均由吉林省农业科学院生物技术研究所保存,以 A188 和 Hi-II 为对照材料(表 1 列出的材料为部分胚性愈伤组织诱导率较好的自交系)。玉米自交系于 2009 年 5 月初种植于吉林省农业科学院(公主岭)试验地。

### 1.2 诱导培养基

胚性愈伤组织诱导培养基为 N6 培养基<sup>[26]</sup>,附加 100 mg/L 肌醇、2.76 g/L 脯氨酸、100 mg/L 水解酪蛋白、2 mg/L 2,4-D、30 g/L 蔗糖、3 g/L 植物凝胶,pH 5.8,高压灭菌后加入硝酸银(4.3 mg/L)。

再生培养基:植株再生培养基为 190-2 培养基<sup>[27]</sup>,附加 30 g/L 蔗糖、3 mg/L 6-BA、3 g/L 植物凝胶,pH 5.8,高压灭菌。

### 1.3 幼胚培养

于 7 月底取授粉后 10~11 d 玉米幼穗(幼胚大小约为 1~2 mm),去除苞叶后,在超净工作台上用 1% 的氯化汞消毒 15 min,再用灭菌水洗涤 3 次。用解剖刀剥取幼胚,幼胚盾片朝上接种于诱导培养基上,每皿培养基接种 20 个幼胚(培养皿大小为直径 100 mm×高 25 mm),于 27℃ 暗培养。两周后统计胚性愈伤组织诱导率(胚性愈伤组织诱导率= $\frac{\text{产生胚性愈伤组织幼胚数}}{\text{培养幼胚数}} \times 100\%$ )。

### 1.4 继代与再生培养

胚性愈伤组织每隔 2 周进行继代培养(继代培养基同诱导培养基),每隔 4 周取部分胚性愈伤组织于再生培养基上进行植株再生,测试胚性愈伤组织的再生能力。

### 1.5 数据统计

本试验采用完全随机试验设计,每皿培养基接种 20 个幼胚,约 100 个幼胚为一个重复,每个基因型共接种约 500 个幼胚。对不同基因型间胚性愈伤组织诱导率进行方差分析,并比较基因型间胚性愈伤组织诱导率差异显著性,利用 DPS 进行数据统计分析。

## 2 结果与讨论

本研究共用了 215 个玉米基因型进行了试

验,大部分基因型胚性愈伤组织诱导率较差或难以诱导胚性愈伤组织。有 28 个基因型胚性愈伤组织诱导率较高(>20%,表 1)且愈伤组织为 II 型胚性愈伤组织(松脆、生长快且再生能力强),基因型间胚性愈伤组织诱导率差异极显著( $P < 0.01$ ),其中 6 个基因型的诱导率高于 A188(72%)和 Hi-II(73%)。“吉 V130”的诱导率最高,为 77.94%(表 1,图 1 a、b),且愈伤组织为 II 型愈伤组织。胚性愈伤组织经过 14 个月的继代培养仍保持较强的再生能力(图 1 c、d),绿苗再生率为 93%。

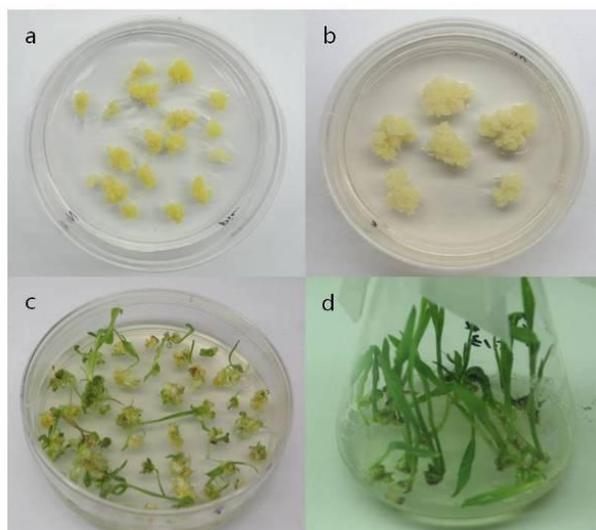


图 1 玉米胚性愈伤组织的诱导与植株再生

注:基因型为吉 V130,a 为胚性愈伤组织的诱导,b 为胚性愈伤组织继代培养,c 为继代 14 个月后胚性愈伤组织的再生情况,d 为绿苗根诱导

在农杆菌介导的玉米遗传转化中,良好的受体系统是转化成功的关键因素。用于玉米转基因受体材料有多种,包括:原生质体、胚性愈伤组织、幼胚以及直接分生组织等。玉米幼胚是进行遗传转化常用的受体材料,已被广泛用于转基因研究中<sup>[3,5,9-10,12-13]</sup>。玉米受体材料必须具有较高的胚性愈伤组织诱导率和再生能力,才有可能获得较高的转化效率。而玉米基因型对胚性愈伤组织的诱导和植株再生起决定作用,是玉米转化效率的主要限制因素。本研究筛选出 28 个胚性愈伤组织诱导率较高的基因型,其中 6 个基因型的诱导率高于 A188 和 Hi-II。这些材料不仅具有很好的胚性愈伤组织诱导率,而且具有较高的再生能力。本研究基因型“吉 V130”胚性愈伤组织诱导率最高,经过长期继代培养的胚性愈伤组织仍保持很强的再生能力。本实验室后期选用“吉 V130”幼胚作为受体材料进行遗传转化,获得了

较高的转化效率。由于该基因型具有相对较好的农艺性状且转化效率高于A188和Hi-II,在今后的玉米转基因研究中,可作为重要的受体材料。

玉米幼胚胚性愈伤组织的诱导主要受基因型、幼胚大小、植株的发育状态及培养条件等因素影响,其中基因型影响最大。玉米幼胚诱导的愈伤组织主要有3种类型,I型为结构致密的块状组织;II型为愈伤组织为结构松脆、生长快、颜色鲜亮的胚性愈伤组织,再生能力强;III型为愈

伤组织呈松软、水浸状,不具有再生能力。本研究不同基因型间胚性愈伤组织诱导率差异较大,变幅为0~78%,这表明了玉米基因型对胚性愈伤组织诱导率的显著影响,这与前人的研究结果相一致<sup>[28-30]</sup>。本试验中部分基因型胚性愈伤组织诱导率(如:农系531、7922、340、8902、Mo17等)与已报道的诱导率有一定的差异<sup>[29, 31-34]</sup>,这可能是因为玉米材料的来源不同,遗传背景有一定的变异以及培养条件的差异造成的。

表1 玉米不同基因型胚性愈伤组织诱导率

%

基因型	胚性愈伤组织诱导率					平均值
	I	II	III	IV	V	
吉V130	81.25	78.00	65.00	76.47	89.00	77.94±8.70
C50	72.73	65.00	86.00	81.00	78.60	76.67±8.08
419	70.00	87.00	77.00	62.00	78.95	74.99±9.45
368	70.00	64.00	88.00	73.00	76.00	74.20±8.90
CP31	62.00	68.75	74.00	78.00	87.00	73.95±9.44
农系531	71.00	62.00	75.00	85.00	70.59	72.72±8.34
Hi-II(CK)	60.00	84.00	75.00	70.00	76.00	73.00±8.83
L×9801	73.00	77.00	70.00	82.00	59.00	72.20±8.64
A188(CK)	70.00	75.00	69.00	83.00	63.00	72.00±7.48
8902	82.00	70.00	62.00	75.00	68.00	71.40±7.54
138	68.00	72.00	77.00	59.00	73.00	69.80±6.83
丹988	70.00	69.23	79.00	64.00	57.00	67.85±8.11
四144	80.00	71.00	58.00	66.00	62.00	67.40±8.53
446-3	78.00	52.00	61.00	68.00	66.00	65.00±9.54
C190	68.00	73.00	54.00	60.00	65.00	64.00±7.31
240K2	62.00	69.00	54.00	65.00	60.00	62.00±5.61
吉1037	57.00	63.00	72.00	52.00	62.00	61.20±7.46
P138	61.00	57.14	64.00	68.00	50.00	60.03±6.88
CP16	49.00	55.00	53.00	60.00	69.00	57.20±7.69
四273	60.00	56.00	53.00	44.00	67.00	56.00±8.51
吉922	56.00	50.00	52.00	64.00	45.50	53.50±6.98
580	59.00	50.00	55.00	40.00	56.00	52.00±7.45
CP87	58.00	54.00	43.50	45.50	49.00	50.00±5.99
2331	54.00	58.00	48.00	40.00	47.00	49.40±6.91
Mo17	47.00	46.00	45.00	36.00	39.00	42.60±4.83
340	45.00	43.00	42.00	31.90	38.00	39.98±5.19
835	46.00	41.00	40.00	32.00	38.00	39.40±5.08
6214	31.00	39.00	26.50	32.00	29.00	31.50±4.69
7922	31.00	35.00	27.00	23.00	27.20	28.64±4.54
Z5	27.00	28.00	25.00	23.00	26.00	25.80±4.66

注:平均值为5个重复的平均值±标准差,基因型间胚性愈伤组织诱导率差异极显著(P<0.01)

### 3 结 论

本研究利用玉米幼胚诱导胚性愈伤组织,根

据胚性愈伤组织诱导率筛选出6个诱导率高于A188和Hi-II的玉米材料;基因型“吉V130”胚性愈伤组织诱导率最高,胚性愈伤组织经过长期继

代培养后仍保持很强的再生能力。在后期作为受体材料进行转基因研究中,获得了较高的转化效率;“吉V130”具有相对较好的农艺性状且转化效率高于A188和Hi-II,在今后玉米转基因研究工作中将发挥重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998:1-39.
- [2] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops [M]. Ithaca, NY, ISAAA, 2014: 1-3.
- [3] 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.
- [4] Lupotto E, Reali A, Passera S, et al. Maize transformation with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 1998(72): 20-22.
- [5] Zhao Z Y, Gu W N, Cai T, et al. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize[J]. Mol Breed, 2001(8): 323-333.
- [6] Frame B R, Shou H, Chikwamba R K, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System[J]. Plant Physiology, 2002(129): 13-22.
- [7] Shou H X, Frame B, Whitham S, et al. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Mol Breeding, 2004(13): 201-208.
- [8] Shou H X, Bordallo P, Fan J B, et al. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(9): 3298-3303.
- [9] Aluru M, Xu Y, Guo R, et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(13): 3551-3562.
- [10] Wang K, Frame B. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation[J]. Methods in Molecular Biology, 2009(526): 29-45.
- [11] 李颖.大麦 *Isa-H1* 基因在玉米中遗传转化的研究[D].长春:吉林农业大学,2011.
- [12] Frame B R, Main M L, Schick R, et al. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos[J]. Methods in molecular biology, 2011(710): 327-341.
- [13] 侯文通,杨俐苹,自由路,等.转植酸酶基因(*phyA2*)玉米磷素营养的初步研究[J].玉米科学,2014,22(1):37-42.
- [14] Lee H, Zhang Z J. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Maize (*Zea mays*) Immature Embryos[J]. Methods in Molecular Biology, 2014(1099): 273-280.
- [15] 孙传波,郭嘉,袁英.农杆菌介导玉米幼胚遗传转化体系的建立[J].湖北农业科学,2014,53(12):2743-2762.
- [16] Frame B R, McMurray J M, Fonger T M, et al. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(10): 1024-1034.
- [17] 梁业红,叶兴国,张世煌.适用于4种玉米基因型的农杆菌转化方法的探讨[J].作物学报,2007,33(5):771-775.
- [18] 范旭红. *BADH* 和 *CMO* 基因的无选择标记表达载体转化玉米的研究[D].长春:吉林农业大学,2007.
- [19] 王昌涛,赵玉锦,李坤远,等.农杆菌介导玉米萌动胚遗传转化新体系的建立[J].华北农学报,2007,22(5):110-113.
- [20] 邸宏,刘昭军,卢翠华,等.农杆菌介导 *bar* 基因转化玉米幼胚的研究[J].东北农业大学学报,2008,39(2):150-154.
- [21] 刘小红.玉米愈伤组织诱导影响因素的研究[J].吉林农业科学,2009,39(3):3-4.
- [22] 曲文利,孙传波,孟凡梅,等.玉米茎尖导入 *SAG12* 基因的初步研究[J].吉林农业科学,2012,37(4):10-11.
- [23] 林凡,张云,蒋明义.玉米杂交种高效再生体系的建立及其影响因素[J].吉林农业科学,2014,39(3):1-4.
- [24] 仇平平,辛相启,刘文浩,等.根瘤农杆菌介导的玉米自交系 A188 愈伤组织再生条件的优化[J].山东农业科学,2012,44(12):28-31.
- [25] 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.
- [26] Chu C C, Wang C C, Su C S, et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources[J]. Sci Sinica, 1975(18): 659-668.
- [27] Wang X Z, Hu H. The effect of potato II medium for Triticale anther culture[J]. Plant Science Letter, 1984(36): 237-239.
- [28] 王钰,潘光堂.具有高再生性且对农杆菌 C58 敏感的玉米自交系材料的筛选[J].西南农业学报,2005,18(5):575-578.
- [29] 郭新梅,张晓东,韩立新,等.不同基因型玉米幼胚愈伤组织的培养特性[J].西北农林科技大学学报,2007,35(4):68-72.
- [30] 刘小红,张红梅,张红伟,等.抗除草剂转基因玉米研究[J].西南农业学报,2007,20(1):53-57.
- [31] 杜娟,胡汉桥,余云舟,等.用基因枪法将 *Bt* 杀虫基因导入玉米自交系的研究[J].吉林农业大学学报,2003,25(3):260-262.
- [32] 姚丹,王丕武,刘占柱,等.农杆菌介导法将 *Bt* 杀虫蛋白基因导入玉米自交系的研究[J].吉林农业大学学报,2004,26(1):27-31.
- [33] 袁鹰,曲喜云,王玉民,等.东北春玉米骨干自交系组织培养再生系统研究[J].玉米科学,2005,13(3):28-31.
- [34] 王永芳,李伟,智慧,等.一个再生能力优异玉米自交系的发现[A].全国植物分子育种研讨会摘要集[C].2009:141.

(责任编辑:范杰英)