

采用玉米 Ubi-1 启动子获得低拷贝转基因玉米植株

徐子勤* 龚莉桂 黄 萱 张永彦 高丽美

(西北大学生物技术陕西省重点实验室,西安 710069)

摘 要 通过基因枪粒子轰击和草丁膦(PPT)选择获得可育的玉米转基因植株,并分析了外源基因在转化体中的拷贝数与启动子之间的关系。用玉米 Ubi-1 启动子驱动外源基因,玉米转化体外源基因的拷贝数较低,可能的原因 Ubi-1 启动子通过与其内部同源序列发生重组而被定点整合进玉米基因组,共转化的两种质粒 DNA 在整合至玉米染色体 DNA 之前已重构成为一个整体。结果显示使用某一植物自身基因的启动子可以降低外源基因在该物种转基因个体中的拷贝数,进而避免基因沉默现象的发生。目前已得到第二代转基因玉米种子。

关键词 玉米 Ubi-1 启动子,基因枪,转基因植物,外源基因,低拷贝数

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0120-06

DNA 直接导入方法(包括基因枪方法)经常导致被转移基因在转化体中以多个拷贝形式存在,其中一些拷贝会发生重排。多拷贝的外源基因是产生基因沉默现象(指外源基因在转基因植株后代中的表达受到抑制或完全失去表达能力)的主要原因。基因沉默一般由顺式失活(通常由 DNA 甲基化引起)、反式失活和被转移基因的不同拷贝之间或被转移基因与同源的內源基因之间的相互抑制等引起^[1-2],还可能与被转移基因在染色体上的插入位点(位置效应)有关^[3]。一些研究报告认为基因沉默的影响可以通过在被转移基因两侧接上一段核骨架结合序列来减小^[4-5]。另外去除质粒 DNA 的重复序列和使用一个适中强度的启动子可以缓解 DNA 甲基化和过量 RNA 积累引起的抑制效应^[1,6]。由以上研究推论,如果被转移基因只被整合一个或少数拷贝(低于 3 个),基因沉默问题也可以在一定程度上被克服。本工作比较了玉米 Ubi-1 启动子和其它启动子对玉米转基因植株中外源基因拷贝数的影响,获得了外源基因拷贝数较低的玉米转化体。

1 材料与方法

1.1 未成熟胚的分离

以 A188 × H99 玉米未成熟胚为起始材料。玉米的温室生长条件为 16h 光照,白天 26℃,夜间 14℃。授粉后约 12d 左右摘取玉米穗,剥出幼嫩种子,用 0.2% Mucosol、1% 次氯酸钠水溶液灭菌 20min,无菌蒸馏水清洗 3 次,在超净台上于实体显微镜下分离未成熟胚。玉米穗或幼嫩种子也可以在

4℃处理过夜,第 2 天分离未成熟胚,以促进培养过程中胚性愈伤组织的形成。将约 0.5 ~ 1mm 大小的未成熟胚接种至含 0.8% 琼脂糖、2% 蔗糖、2mg/L 2,4-D 和 500mg/L 水解酪蛋白的 N6 培养基^[7]上,胚轴向下、盾片组织朝上于 26℃、黑暗条件预培养 1 周。随时去除长大的胚芽鞘等胚轴组织。

1.2 质粒构建和共转化组合

使用了 5 种质粒,由德国汉堡大学普通植物学研究所 Horst Lörz 教授、Reinhold Brettschneider 博士和 Dirk Becker 博士提供。pUbi :GUS 含有由玉米 Ubi-1 启动子^[8]控制的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶基因(*uidA*, *gus*) ;p35S :BAR 含有由 CaMV 35S 启动子控制的 *bar* 基因,该基因分离自潮湿霉菌,编码草丁膦乙酰转移酶,使转化组织对除草剂 PPT 产生抗性^[9] ;pAct :In1 含有一个由水稻 Act-1 启动子^[10]控制的目的基因(In1) ;pUbi :In2 含有一个由玉米 Ubi-1 启动子控制的目的基因(In2) ;pDB1 含有由水稻 Act-1 启动子控制的 *gus* 基因和由 CaMV 35S 启动子控制的 *bar* 基因^[11] ;共转化组合分别为 (p35S :BAR)+(pAct :In1) (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)或 pDB1 +(pUbi :In2)。

1.3 基因枪轰击条件和转基因植株再生

基因枪轰击之前,将未成熟胚预培养形成的 I-型胚性愈伤组织转至含 0.6mol/L 蔗糖的 N6 培养基上处理 3 ~ 5h。通过 $CaCl_2$ 、亚精胺方法将两种不同质粒 DNA 各 2.5 μ g 沉积在金微粒上,参考 Brettschneider 等方法^[12]进行轰击。轰击的愈伤组织在高渗培养基上继续处理 16 ~ 20h 后转至正常 N6 培养基于 26℃、黑暗条件培养 2 周。接着将愈伤组织转至含

收稿日期 2003-06-10,修回日期 2003-09-15。

基金项目 教育部高等学校骨干教师计划、陕西省重点实验室资助计划、陕西省教委重点科研计划(No.99JK13)和陕西省自然科学基金重点项目资助。

* 通讯作者。Tel :86-29-8303484 ;E-mail :zixinxu@163.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

2 或 5mg/L PPT 但不含水解酪蛋白的 N6 培养基选择培养 2 周。选择培养后的愈伤组织转至不含激素和水解酪蛋白、但含 2 或 5mg/L PPT 的 MS₀ 培养基于 24℃、每天光照 16h(3000 lux)进行再生。2cm 以上再生植株转至 Magenta 盒培养,培养基为 1/2 MS₀。8cm 以上再生植株移栽至土壤,温室生长 1 周后用 250 mg/L PPT 水溶液喷洒。

1.4 外源基因的 Southern 印迹杂交分析

从 PPT 喷洒后存活的假定转基因植株叶片和对照植株叶片提取总基因组 DNA,20μg DNA 用相应的限制性内切酶消化后,经 0.8% 琼脂糖凝胶于 100V 电泳 2~4h 进行分离。转移 DNA 至尼龙膜(positively charged,Boehringer Mannheim),用紫外线进行交联处理。通过非放射性地高辛化学发光方法检测外源基因,并分析其拷贝数。用地高辛标记的 *bar*、*uidA* 和相关基因片段为探针进行 Southern 印迹杂交。GUS 染色参考 Becker 等方法^[1]。

2 结 果

2.1 选择培养和转基因玉米植株再生

82% 以上的 A188 × H99 玉米未成熟胚盾片组织在离体培养 1 周之后,可以产生质地紧密的 I-型胚性愈伤组织。对 I-型胚性愈伤组织在轰击前后分别进行 3~5h 和 16~20h 的高渗处理,每次轰击的金微量为 30μg。轰击的 I-型胚性愈伤组织在不含选择剂的 N6 培养基上于 26℃ 暗中培养 2 周后,表面产生大量明显的体细胞胚结构,但这些胚性结构与愈伤组织不能分开(图 1-a)。

将具有体细胞胚结构的 I-型胚性愈伤组织转至选择培养基培养 2 周后,出现很多成熟的体细胞胚。胚性组织转至再生培养基光照培养 2 周后,约一半的体细胞胚在 PPT 存在下仍然保持白色,不能变绿;只有那些绿色的成熟胚可以在无激素 MS 培养基上发育成完整植株。生根的小植株转至 1/2 MS 无激素培养基长至 8cm 时,移至土壤,4~6d 后揭去覆盖的塑料盖或玻璃瓶。再生植株在温室中长出 2~3 片新生叶时,用 0.2% Tween-20、250mg/L PPT 水溶液喷洒 2 次,2 次间隔为 1 周。假转化体在 2 周后叶片枯黄死去,真正的转基因植物生长正常,不表现任何伤害症状(图 1-b)。用 p35S :BAR 和 pAct :In1 共转化时,在附加 2mg/L PPT 的 MS 培养基上得到的再生体绝大多数为漏网的非转化体。用 p35S :BAR 和 pUbi :GUS 共转化时,MS 培养基中的 PPT 浓度增加至 5mg/L,36% 的再生植株为真正的转基因植物。再生植株茎杆中花青素的合成可以用来区别和判断转化体。一般而言,转基因植株在选择培养基上生长正常,茎杆绿色,没有花青素合成,而非转化再生植株在选择压力下茎杆发红,并逐渐枯黄。用 pDB1 和 pUbi :In2 共转化时,将轰击的 I-型胚性愈伤组织在未加选择剂的培养基上黑暗培养 2 周后,直接转至含选择剂的 MS₀ 培养基光照培养,再生频率明显提高,但转化频率并未上升(表 1)。

2.2 转基因玉米植株的 Southern 印迹杂交分析

为了分析启动子对转基因植物中外源基因拷贝数的影响,本工作采用不同质粒组合对玉米未成熟胚盾片组织来源的 I-型胚性愈伤组织进行了共转化,质粒组合分别为 (p35S :BAR)+(pAct :In1)、(p35S :BAR)+(pUbi :GUS)或 pDB1 +(pUbi :In2)。Southern 印迹杂交分析显示所有 PPT 喷洒后存活的植株均具有完整拷贝的外源基因。当用 p35S :BAR 与 pUbi :GUS 进行共转化时,转基因玉米具有两个拷贝的 *gus* 基因,其中一个为完整拷贝,另一个为不完整拷贝(转基因植株 X21、X22、X23、X24、X25),*bar* 基因只有 1 个拷贝。与此相反,当 p35S :BAR 和 pAct :In1 共转化时,转基因玉米植株在 4~8 个位点整合有 *bar* 基因,并且发生了重排(转基因植株 X11、X12 和 X13)。这一结果反映出某一物种自身基因的启动子在产生含单拷贝或低拷贝(2~3)外源基因的该物种转基因植物方面可能十分有用。

图 2 显示从 (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)组合得到的 5 株 GUS 反应阳性的玉米植株(图 1-c,d)的 Southern 印迹分析结果。*EcoR* I 在 pUbi :GUS 中只有一个酶切位点,且位于 *nos* 终止子后,它可以将 pUbi :GUS 切割成线性双链 DNA 分子。*EcoR* I 消化基因组 DNA 后杂交带的多少代表 *gus* 基因在转基因玉米基因组中的拷贝数或整合位点数。在 5 株转基因植物中,发现 *gus* 基因只有一个完整拷贝和另一个不完整拷贝,并且具有相同的带型,说明外源基因被定点整合进了玉米基因组。*EcoR* I 和 *Hind* III 可以切下约 3.5kb 的 DNA 片段,该片段包含 Ubi-启动子、*gus* 编码区和 *nos* 终止子序列。

对来自 (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)组合的 5 株 GUS 阳性植株(X21、X22、X23、X24 和 X25)和来自 (p35S :BAR)+(pAct :In1)组合的 PPT 喷洒后存活的三株玉米植株(X11、X12 和 X13)用 *bar* 基因探针进行检测,结果显示 X11、X12 和 X13 三株转基因植物含 4~8 个拷贝的 *bar* 基因,并且发生了重排,一些拷贝的酶切位点已发生改变(图 3)。与此相反,X21、X22、X23、X24 和 X25 五株来自 (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)组合的转基因植物具一个拷贝的 *bar* 基因(图 4)。*EcoR* I 在 p35S :BAR 中只有一个酶切位点,且位于 35S 启动子之前,它可以将 p35S :BAR 切成线性 DNA,杂交带的多少反映 *bar* 基因在转基因植物中的拷贝数。*EcoR* I /*Hind* III 可以切下一条约 1.35kb 的 DNA 片段,其中包含 CaMV 35S 启动子、*bar* 基因编码区和 *nos* 终止子序列。对 PPT 喷洒后存活的来自 X21 的 T1 代转基因植物进行分析,结果与亲本植株 X21 相同,未发生改变。第三组合采用 pDB1 和 pUbi :In2 共转化,得到的一株转基因植物 X31 含有一个拷贝的 In2 基因、两个拷贝的 *bar* 基因和三个拷贝的 *gus* 基因(图 5)。

以上结果显示使用玉米 Ubi-1 启动子时,外源 DNA 可能通过该启动子与其内源 DNA 序列发生同源重组而被定点整合进玉米基因组;同时,共转化的两种质粒 DNA 在转化过程中可能已重构成一个整体大分子。

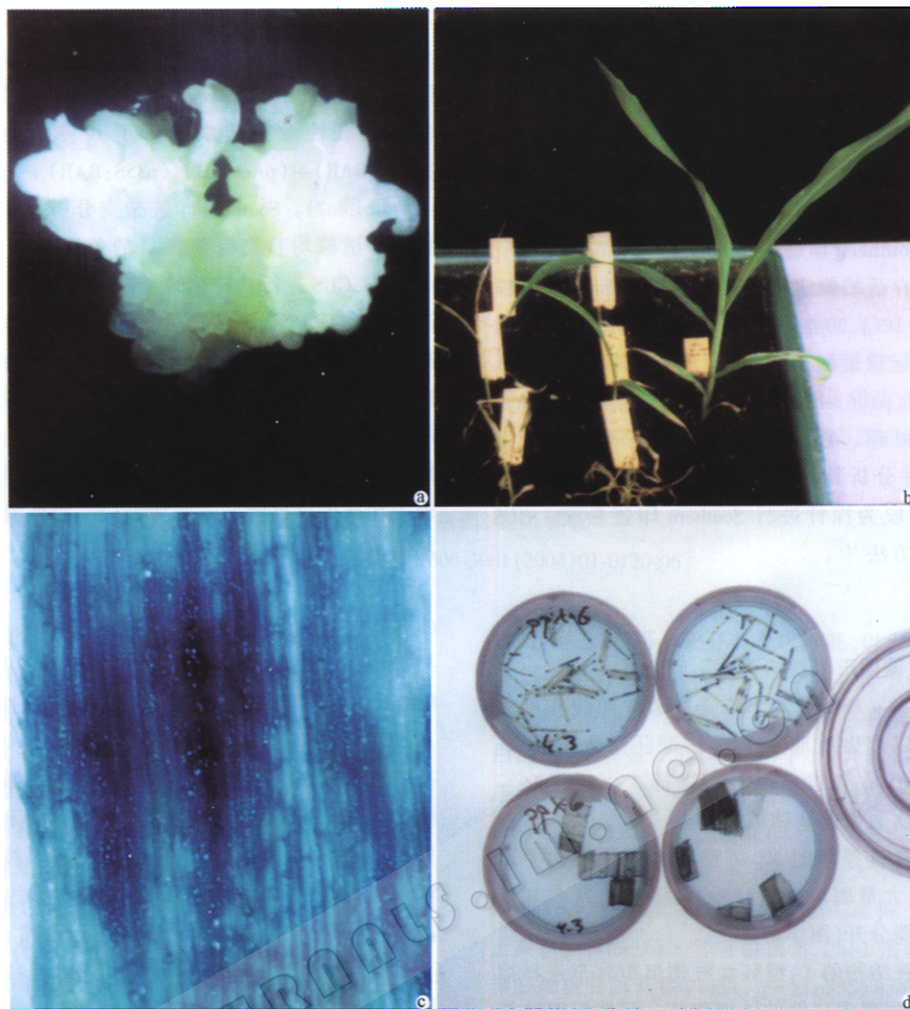


图 1 转基因玉米植株的再生和 GUS 染色分析

Fig.1 Regeneration and GUS staining of transgenic maize plants

a: type- I embryonic calluses derived from scutellum tissue of A188 x H99 immature embryo;

b: transgenic maize plants survived PPT spraying;

c: GUS staining of leaf of transgenic maize plants came from (p35S: BAR) + (pUbi: GUS) cotransformation;

d: GUS staining of cob leaves and silks of transgenic maize plants came from (p35S: BAR) + (pUbi: GUS) cotransformation

3 讨 论

在以前报道的有关玉米胚性愈伤组织的转化实验中,转化频率介于 0.4% 至 4% 之间^[12]。这一数据是相对于轰击的胚数目来计算的,即轰击 100 个胚,可得到 0.4 至 4 株转基因植物。本工作在 (p35S: BAR) + (pUbi: GUS) 组合实验中得到 55 个轰击未成熟胚得到 5 株转基因植物;这些植物均表现可育,并在 4 个月内收到成熟种子。Southern 印迹杂交证据显示这些转基因植物都含有一个完整拷贝和另一不完整拷贝的 *gus* 基因,而共转化的由 CaMV 35S 启动子控制的 *bar* 基因也只具 1 个拷贝。这说明采用玉米 Ubi-1 启动子可以产生低拷贝数或单拷贝的玉米转基因植物。这一现象合理的解释为表达载体进入细胞核后与玉米基因组内部的 Ubi-1 启动子通过同源重组而进行整合。相反,当 CaMV 35S 启动子配合水稻 Act-1 启动子共转化时,转基因玉米中含 4~8 个拷贝的

bar 基因。通过本工作改进的转化体系,如果玉米未成熟胚盾片组织具有较强的植株再生能力,从开始胚分离到得到转基因植株只需 80d 左右的时间。目前 T2 代种子也已经成熟。

基因表达是玉米转基因研究中的热点问题^[13]。外源基因的表达情况、遗传规律和稳定程度决定转基因植物的可用性,而启动子对基因表达起着决定性的作用^[14-15]。大多数由 DNA 直接转移产生的转基因植物含有多拷贝的外源基因,并且常常发生重排。多个同源 DNA 片段的存在往往导致基因沉默,这一现象一定程度上与 DNA 甲基化有关。基因沉默可以由转移基因自己的 mRNA 诱发,随植物发育进程增强,在后代中的发生还依赖于某些环境因素。甲基化和重排现象也是 Southern 杂交分析中复杂带型产生的原因。Kumpatla 和 Hall 等报告 Ubi-1 启动子的甲基化导致外源基因不能转录,含有多拷贝转移基因的水稻产生的子一代植株虽

含有 *bar* 基因 ,但对除草剂 PPT 表现敏感 ,这种抗性丢失及表达不稳定和一个含有几个重复序列的转移基因位点有关^[6]。多拷贝还导致外源基因的非孟德尔分离 ,使其遗传规律发生改变。在玉米中也观察到由多拷贝引起的转移基因分离变异现象^[16]。Van de Krol 等发现导入一个完全拷贝的查尔酮合成酶基因(*CHS*)和二氢黄酮 4 还原酶基因(*DFR*)可以专一性抑制内源 *CHS* 和 *DFR* 基因的活性 ;同时发现 *DFR*

转移基因与内源 *DFR* 基因之间存在相互抑制现象^[17]。Napoli 等^[18]也观察到嵌合牵牛 *CHS* 基因的导入可以封闭花青素的生物合成 ,内源和外源的 *CHS* 基因相互抑制 ,他们把这一现象命名为共抑制 ,并认为与甲基化有关。所有这些结果暗示外源基因以一个拷贝形式存在对基因工程体系的实用性非常重要。

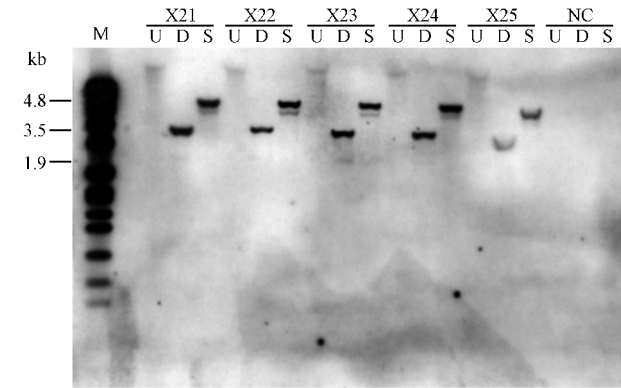


图 2 (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)共转化所获转基因玉米植株中 *gus* 基因的 Southern 印迹分析

Fig.2 Southern blotting analysis of *gus* gene in transgenic maize plants came from

(p35S :BAR)+(pUbi :GUS)cotransformation

M :the DIG-labelled MV II marker(Boehringer

Mannheim , Germany) ; U :uncut genomic DNA ;

D :genomic DNA digested with *EcoR* I and *Hind* III ;

S :genomic DNA digested with *EcoR* I ;

NC :negative control ; X21 , X22 , X23 , X24 , X25 :

5 transgenic maize plants regenerated from

(p35S :BAR)+(pUbi :GUS)cotransformation

NC X21 X22 X23 X24 X25 T21

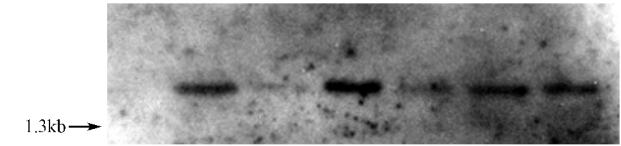


图 4 p35S :BAR 和 pUbi :GUS 共转化所获转基因玉米中 *bar* 基因的拷贝数分析

Fig.4 Copy number analysis of *bar* gene in transgenic

plants came from (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)cotransformation

NC :negative control ; X21 , X22 , X23 , X24 , X25 5 transgenic

maize plants came from (p35S :BAR)+(pUbi :GUS)cotransformation ;

T21 :T1 progeny of X21 ; Genomic DNA was digested with *EcoR* I

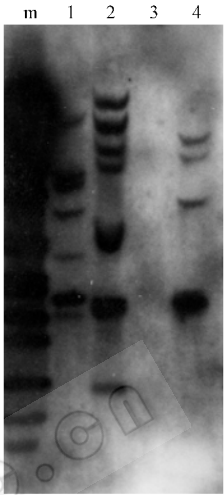


图 3 p35S :BAR 和 pAct :In1 共转化所获转基因玉米中 *bar* 基因的拷贝数分析

Fig.3 Copy number analysis of *bar* gene in

transgenic plants came from (p35S :BAR)+

(pAct :In1)cotransformation

m :DIG-labelled MV II marker(Boehringer Mannheim ,

Germany) ; 1 :X11 ; 2 :X12 ; 3 :negative control ;

4 :X13 ; Genomic DNA was digested with *EcoR* I

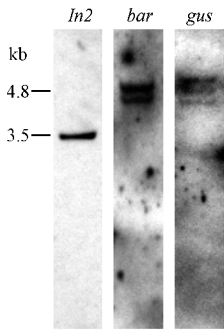


图 5 pDB1 和 pUbi :In2 共转化所获转基因玉米 X31 中外源基因的拷贝数分析

Fig.5 Copy number analyses of transgenes in transgenic plant

X31 came from pDB1 +(pUbi :In2)cotransformation

Genomic DNA was digested with *Bam*H I or *Hind* III

表 1 不同质粒组合对转移基因拷贝数的影响

Table 1 Influence of different plasmid combination on copy number of transgenes

Combination of co-transformed plasmids	Number of bombarded embryos	PPT concentration (mg/L)	Number of transplanted plants	Number of transgenic plants	Copy number of transgenes
(p35S :BAR)+(pAct :In1)	107	2	64	3	4 ~ 8
(p35S :BAR)+(pUbi :GUS)	55	5	14	5	1 ~ 2
pDB1 +(pUbi :In2)	64	2	75	1	1 ~ 3

虽然根癌农杆菌介导的转化可以产生低拷贝数的转基因植物,但对玉米迄今为止只有一例证据充足的报道^[9],所用材料只有 A188 一个基因型或该基因型与其它 5 个品系的杂交 F1 代未成熟胚。所以,目前急需找到一种产生单拷贝或低拷贝数转基因植物的方法。本实验结果显示使用玉米自己的 Ubi-1 启动子,是产生低拷贝数玉米转基因植物的一条有效途径。

致谢 本工作得到德国汉堡大学普通植物学研究所 Horst Lörz 教授、Reinhold Brettschneider 博士和 Dirk Becker 博士的热情帮助和大力支持,在此谨致衷心的感谢!

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wu R. Report of the committee on genetic engineering, molecular analysis of rice genes. *Rice Genetics Newsletter*, 1997, **14**: 23 – 25
- [2] Liu Y(刘杨), Jiang Y(蒋彦), Qiao DY(乔代蓉) *et al.* The mechanism and application of posttranscriptional gene silencing. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(2): 140 – 143
- [3] Matzke MA, Matzke AJM. How and why do plants inactivate homologous transgene? *Plant Physiol*, 1995, **107**: 679 – 685
- [4] Allen GC, Hall G, Michalowski JS *et al.* High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*, 1996, **8**: 899 – 913
- [5] Sidorenko L, Bruce W, Maddock S *et al.* Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants. *Transgenic Res*, 2003, **12**(2): 137 – 154
- [6] Kumpatla SP, Hall TC. Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *Plant J*, 1998, **14**(1): 129 – 135
- [7] Chu CC, Wang CC, Sun CS *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* (Beijing), 1975, **18**: 659 – 668
- [8] Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. Maize poly ubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript slicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*, 1992, **18**: 675 – 689
- [9] Thompson CJ, Movva NR, Tizard R *et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J*, 1987, **6**: 2519 – 2524
- [10] McElroy D, Zhang W, Cao J *et al.* Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 1990, **2**: 163 – 171
- [11] Becker D, Brettschneider R, Lörz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J*, 1994, **5**(2): 299 – 307
- [12] Brettschneider R, Becker D, Lörz H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 737 – 748
- [13] Duncan DR, Kriz AL, Paiva R *et al.* Globulin-1 gene expression in regenerable *Zea mays* (maize) callus. *Plant Cell Rep*, 2003, **21**(7): 684 – 689
- [14] Rasco-Gaunt S, Liu D, Li CP *et al.* Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize. *Plant Cell Rep*, 2003, **21**(6): 569 – 576
- [15] Raizada MN, Brewer KV, Walbot V. A maize MuDR transposon promoter shows limited autoregulation. *Mol Genet Genomics*, 2001, **265**(1): 82 – 94
- [16] Cooley J, Ford T, Christou P. Molecular and genetic characterization of elite transgenic plants produced by electric discharge particle acceleration. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 97 – 104
- [17] Van de Krol AR, Mur LA, Beld M *et al.* Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990, **2**: 291 – 299
- [18] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, **2**: 279 – 289
- [19] Ishida Y, Saito H, Ohta S *et al.* High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 1990, **14**: 745 – 750

Transgenic Maize Plants with Low Copy Number of Foreign Genes were Produced with Maize Ubi-1 Promoter

XU Zi-Qin* GONG Li-Gui HUANG Xuan ZHANG Yong-Yan GAO Li-Mei

(Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Direct DNA delivery procedures (include biolistics method) often resulted in multiple copies of the transgenes in transformants and certain copies of them were rearranged. Integration of multiple copies of the introduced genes was the main reason of gene silencing which meant inhibition or loss of foreign gene expression in filial generations of transformants. In the present work, we compared the influences of maize Ubi-1 promoter and other promoters on copy number of transgenes in maize transgenic plants. Immature embryos from *Zea mays* L. plants of sib-pollinated of A188 × H99 genotype were used as initial materials. Type-I embryonic calluses derived from preculture of immature embryos were treated on N6 medium containing 0.6 mol/L sucrose for 3 ~ 5 hours and transformed via particle bombardment with PDS1000/He delivery system (Bio-Rad). Bombarded callus-

es were treated with hyperosmotic N6 medium for 16 ~ 20 hours continuously. Then the cultures were transferred onto normal N6 medium and incubated at 26°C in dark for two weeks and subsequently selected on N6 medium supplemented with 2 or 5 mg/L phosphinothricin (PPT) but without casamino acid for another two weeks. The calluses after selective culture were transferred onto hormone-free MS medium containing 2 or 5 mg/L PPT but without casamino acid, and incubated at 24°C under 16h illumination for plant regeneration. Regenerated plantlets over 2cm in height were transferred to Magenta box containing 1/2 hormone-free MS medium. Plantlets over 8cm in height were transplanted to soil. After growing for one week in greenhouse, the plants were sprayed with 250mg/L PPT solution. Fertile transgenic maize plants were regenerated and confirmed by Southern blotting and histochemical localization of β -glucuronidase (GUS) activity. Relations between promoter and copy number of transgenes in transformants were analyzed. Maize transgenic plants possessing an intact copy and another incomplete copy of β -glucuronidase gene (*gus*) were obtained in case *gus* gene under the control of maize Ubi-1 promoter (pUbi :GUS). Simultaneously the co-transformed phosphinothricin acetyltransferase gene (*bar*) controlled by CaMV 35S promoter in another plasmid (p35S :BAR) also existed with only one copy. When pDB1 and (pUbi :in2) were cobombarded, the regenerated transgenic maize plant exhibited with only one copy of *in2* gene too. It suggested that the copy number of transgenes in maize transformants was low if the transgenes controlled by maize Ubi-1 promoter. The possible reason might be that the foreign genes were integrated site-specifically via homologous recombination between Ubi-1 promoter and its endogenous sequences in maize genome, and two cotransformed plasmids had reconstructed as one intact molecule before integrating into maize chromosome. On the contrary, if p35S :BAR was cobombarded with plasmid pAct :In1 containing rice Act-1 promoter (without maize Ubi-1 promoter), the transgenic maize plants had 4 ~ 8 copies of *bar* gene. These results reflected that utilization of self gene promoter could reduce the copy number of the transgenes in transgenic plants of certain species itself and avoid the occurrence of gene silencing. T2 seeds have been harvested.

Key words maize Ubi-1 promoter, particle bombardment, transgenic plant, foreign gene, low copy number

Received : 06-10-2003

This work was supported by Backbone University Teacher Project of National Education Ministry of China, Research Project of Provincial Key Laboratory of Shaanxi, Major Scientific Research Project of the Education Department of Shaanxi Province (No.99JK13) and Major Research Project of Natural Science Foundation of Shaanxi Province.

* Corresponding author. Tel : 86-29-8303484 ; E-mail : ziqinxu@163.com