

根癌农杆菌介导反义蜡质基因获得 水稻植株研究初报^{*}

孟昭河, 孟巧霞, 刘永巍, 李春光, 张景龙

(黑龙江省农垦科学院水稻研究所, 佳木斯 154025)

摘要: 采用根癌农杆菌介导法, 将水稻反义蜡质基因导入寒地 4 个水稻品种(系)成熟胚的愈伤组织。这些愈伤组织经连续 2 次 25~50 mg/L 潮霉素抗性筛选, 获得抗性愈伤组织的转化频率为 12.15%~25.95%, 经分化培养, 不同品种的绿苗转化频率分别为 2.49%~4.43%。分化成苗的植株经 GUS 检测, 80%以上的植株叶片呈阳性反应, 显示兰色。经 PCR 检测, 也能扩增出外源基因相应的 DNA 片断, 证明外源基因已整合到转基因植株中。

关键词: 反义蜡质基因; 遗传转化; 根癌农杆菌; 水稻

中图分类号: S 511.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2005)02-0008-04

Primary Studies on Transformation of Waxy Antisense Gene Mediated by *Agrobacterium* in Japonica Rice

MENG Zhao he, MENG Qiao xia, LIU Yong wei, LI Chun guang, ZHANG Jing long

(Rice Research Institute of Land Reclamation Academy of Heilongjiang Province, Jiamusi 154025)

Abstract: Waxy antisense gene was transferred into calli derived from immature embryos of four rice varieties by *Agrobacterium tumefaciens*. These calli were cultivated on selective media containing 25~50 mg/L Hygromycin two times, 12.15%~25.95% resistant calli. These resistant calli were transferred to differentiation and regeneration media, 2.49%~4.43% calli grown up to plants. Assay of Gus activity showed that more than 80% of transgenic plants are Gus positive. A few transgenic plants which were negative for the Gus assay were analysed by PCR, foreign DNA fragments were detected in these plants. The results showed that foreign genes have been inserted into rice plants.

Key words: waxy antisense gene; transformation; *agrobacterium tumefaciens*; rice

黑龙江省水稻面积已发展到 167 万 hm^2 , 是黑龙江省重要的粮食作物之一。尽管传统的遗传研究和常规育种在过去的三十年间已为水稻产量的提高和品质的改善作出了重要贡献。但是, 由于我省位于寒地, 水稻品种资源的匮乏及常规育种方法的局限性, 给水稻进一步的遗传改良带来一定的困难。随着分子生物学的深入, 基因的分离、克隆和重

组技术以及转基因技术的日趋成熟, 遗传转化已成为作物遗传改良的一种有效手段。

应用于植物转基因的方法有多种, 其中根癌农杆菌介导的转基因方法首先是在烟草中获得成功。此后, 因其方法简单易行, 导入的外源基因较为完整, 而且拷贝数少, 而受到广泛的关注。水稻的根癌农杆菌介导的转基因研究始于 1990 年, 由于一系列

* 收稿日期: 2004-11-22

本试验得到了上海农科院作物育种栽培研究所沈革志研究员、殷丽青副研究员和中科院上海植物生理研究所王宗阳研究员的大力支持和指导, 在此表示感谢!

基金项目: 国家“863”和黑龙江省农垦总局项目

第一作者简介: 孟昭河(1966-), 男, 黑龙江省勃利县人, 副研究员, 从事植物生物技术育种研究。

技术上的障碍,一度曾处于低潮。但是近几年,因技术上的突破,先后在不同实验室、不同的稻种中获得成功,但也留下了许多有待解决的问题^[1~6]。本文旨在概述根癌农杆菌介导对寒地水稻成熟胚的遗传转化研究,分析与遗传转化有关的若干因素及其局限性,摸索出适应寒地水稻的一套高效转化方法,为水稻生物技术育种服务。

为了摸索一套将根癌农杆菌介导的遗传转化技术有效地应用于水稻育种,我们选择了水稻反义蜡质基因作为目的基因,通过遗传转化将该基因导入水稻,并对其后代进行选择,希望从中选育出胚乳中直链淀粉含量有所下降的材料,达到改善稻米食味品质的目的⁷。

本文报道根癌农杆菌介导水稻反义蜡质基因的遗传转化和转基因植株鉴定的一些方法和结果。

1 材料和方法

1.1 水稻品种(系)

取去壳的成熟胚的空育 131、垦鉴稻 6 号、垦鉴稻 7 号、垦 01-612 种子,作为转化的外植体材料,由本所引进或育成。

1.2 质粒和菌种

p13w4 质粒是由中国科学院上海植物生理研究所遗传因子组构建并提供。该质粒含有蜡质基因启动子、蜡质基因反义片段和 GUS 基因组成的融合结构。并通过冻融法将该质粒导入根癌农杆菌

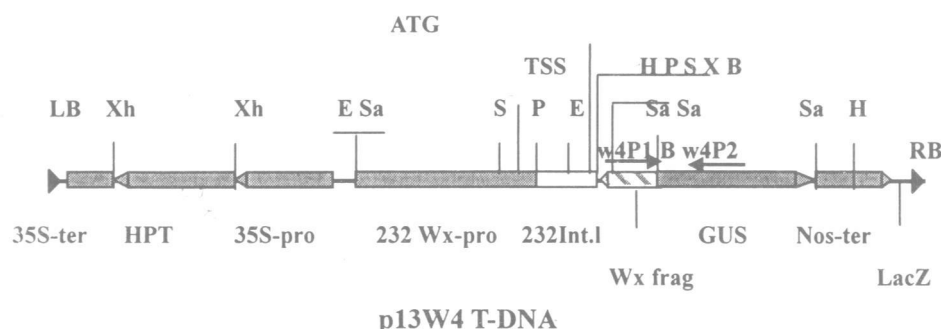


图1 双元载体 p13W4 T-DNA 区的结构

EHA105 菌种。

1.3 农杆菌培养

取保存的菌种在 YEB 固体培养基上划平板, 28℃培养 2 d。从平板上挑取单菌落接入 5 mL YEB (含 Kan) 液体培养基中, 28℃培养过夜。吸取 1 mL 农杆菌培养液, 转入 50 mL AB (含 Kan) 液体培养基中, 在 28℃150 rpm 震荡培养下过夜。4 000 rpm 离心, 收集菌体, 并将菌体重悬于 AAM 液体培养基, OD₆₀₀ = 0.6~1.0 时用于共培养。

1.4 水稻成熟胚培养

去壳的水稻成熟种子经 70%乙醇表面消毒后, 用 2% (活性氯含量) NaClO 溶液浸泡 30 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 培养于诱导培养基 (N₆+2.4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+水解酪蛋白 0.5 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 6 g/L, pH 值 5.8) 上诱导愈伤组织, 10~15 d 后从成熟胚盾片处长出的愈伤组织, 拨出成熟胚的愈伤组织, 切去芽, 接种于诱导培养基中 5~7 d。

1.5 遗传转化和植株再生

继代后, 取出生长良好的愈伤组织, 浸入农杆菌菌液感染并不断地搅拌, 20 min 后取出。用无菌吸水纸吸干后, 把愈伤组织转入共培养培养基 (N₆+2.

4 D 2 mg/L+水解酪蛋白 0.5 mg/L+蔗糖 30 mg/L+葡萄糖 10 g/L+琼脂粉 6 g/L+乙酰丁香酮 100 μL/L, pH 值 5.2), 于 26℃暗培养。3 d 后将愈伤组织转移到无菌的三角烧瓶中, 用无菌水冲洗去农杆菌, 冲洗 2~3 次, 用无菌吸水纸吸干后, 转入带有抗生素和筛选剂的选择培养基 (N₆+2.4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+水解酪蛋白 0.5 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7.0 mg/L+潮霉素 25 mg/L+羧苄青霉素 500 mg/L, pH 值 5.8)。2 周后, 取选择培养基上长出的愈伤组织, 转入新鲜的筛选培养基上继续筛选培养 (潮霉素为 50 mg/L)。经 2 次筛选培养后, 将抗性愈伤组织转入预分化培养基中 (CC 大量+Ms 微量+CC 有机+甘露醇 33.6 g/L+BA+0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+2.4-D 1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 6 g/L+潮霉素 25 mg/L+羧苄青霉素 300 mg/L)。经 2 周后将抗性愈伤组织转入分化培养基中 (MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+水解酪蛋白 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 7.0 mg/L+玉米素 0.2 mg/L+潮霉素 25 mg/L+羧苄青霉素 300 mg/L, pH 值 5.8)。置于 26℃, 15 h/d 光照条件下进行分化培养。10~15 d 愈伤组织形成小苗, 然后, 转入

生根培养基(Ms+Met1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L+水解酪蛋白0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂粉7.0 mg/L+多效唑2 mg/L+潮霉素25 mg/L+羧苄青霉素300 mg/L, pH 值5.8), 待再生植株完整根系形成后, 移至人工气候室或大田种植。

1.6 组织化学定位反应

按 Jefferson (1987) 的方法^[8], 取抗性愈伤组织、再生植株叶片或转基因植株的米粒进行 GUS 检测。

1.7 水稻总 DNA 提取

按 Edwards 等 (1991) 的方法^[9] 进行总 DNA 提取。

1.8 PCR 检测

根据 p13w4 质粒中蜡质基因反义片段和 GUS 融合基因片段, 设计了引物 W₄P₁ 和 W₄P₂ 分别对转基因植株进行 PCR 检测。引物 W₄P₁ 的序列是 (5' TGGCAAGAACAAGCATAGACC - 3'), 引物 W₄P₂ 的序列是 (5' TAACATACGGGCGTGACATCG - 3')。PCR 反应体系包括 2 μL DNA 模板, 2.5 μL 10× PCR 缓冲液, 2 μL 2 mmol/L dNTPs, 引物各 100 pmol, 0.5 u Taq DNA 聚合酶, 加无菌水至 25 mL。PCR 循环参数为 94℃ 5 min, 之后 92℃

45 s、60℃ 45 s、72℃ 1 min 进行 30 个循环。反应结束后取 2 mL 反应液进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物为 626bp。

2 结果与分析

2.1 反义蜡质基因的导入及转化植株再生

2.1.1 反义蜡质基因的导入 不同品种的成熟胚培养于诱导培养基, 所形成的愈伤组织速度和大小有一定的差异, 空育 131、垦鉴稻 6 号明显好于垦鉴稻 7 号、垦 01-612。但是, 在粳稻中, 一般 10~15d 均能形成直径为 2 mm 左右的带胚芽愈伤组织, 经继代后的愈伤组织即可用于农杆菌感染和共培养。通常共培养 3 d 后, 少数愈伤组织开始变褐死亡, 而大部分生长良好, 仍为黄色, 将生长良好的愈伤组织转入含潮霉素 25 mg/L 选择培养基进行抗性筛选, 3~7 d 后, 未转化的愈伤组织停止生长, 并开始变褐死亡, 而转化的愈伤组织上产生新鲜的黄色愈伤组织。筛选培养 2 周后, 将生长良好的愈伤组织转入新鲜的选择培养基, 进行第二次抗性筛选, 抗性愈伤组织仍生长旺盛 (见图 2), 但部分愈伤组织开始变褐死亡。

2.1.2 转化植株的形成 经 2~3 次筛选培养后,

表 1 水稻抗性愈伤组织的筛选和转化频率

品种	愈伤数 (块)	抗性愈伤数 (块)	愈伤转化频率 (%)	转基因植株 (份)	植株转化频率 (%)
空育 131	1237	294	23.75	53	4.28
垦鉴稻 7 号	582	98	16.84	21	3.61
垦鉴稻 6 号	1106	287	25.95	49	4.43
垦 01-612	683	83	12.15	17	2.49

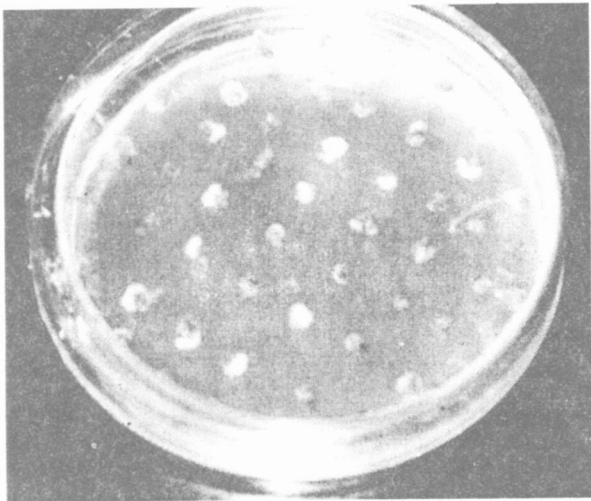


图 2 生长于选择培养基上的愈伤组织

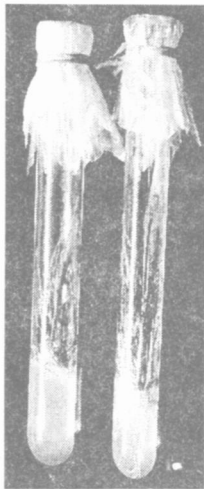


图 3 水稻转基因植株

将生长良好的愈伤组织转到含羧苄青霉素和潮霉素的分化培养基上进行分化培养, 10 ~ 15 d 左右可形成小苗, 再生小苗转入生根培养基, 培养 2 周后, 形成完整的小植株(见图 3)

在 4 个水稻品种的遗传转化中, 统计了各自的愈伤组织转化频率和植株转化频率, 结果显示: 品种间的遗传转化频率有一定的差异, 愈伤组织的转化频率为 12.15% ~ 25.95%; 植株的转化频率为 2.49% ~ 4.43%, 其中, 空育 131 和垦鉴稻 6 号的植株转化频率高达 4.28% 和 4.43%, 垦鉴稻 7 号和垦 01-612 的植株转化频率分别为 3.61% 和 2.49%。

转基因植株种植于温室, 除极少数植株生长和育性异常, 表现植株矮小、结实差外, 绝大部分植株生长发育良好, 并正常结实。

2.2 转基因植株的组织化学鉴定

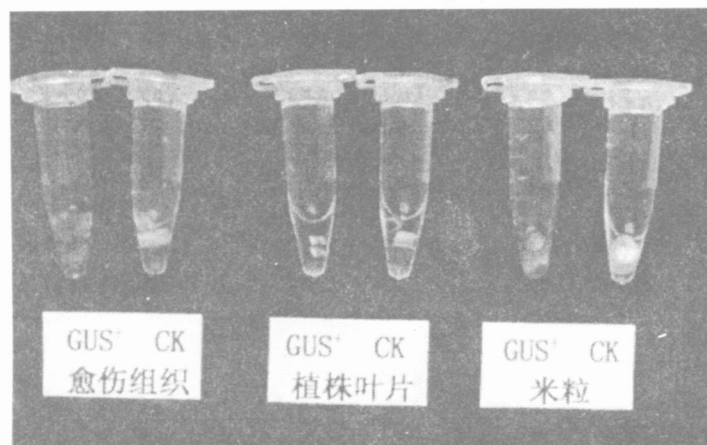


图 4 水稻转基因不同组织器官的 GUS 检测

插入水稻基因组中。

2.3 PCR 分子检测验证

在转基因研究中, 有时会出现基因沉默的现象^[10, 11]。为此, 对 GUS 检测呈阴性的部分转基因植株进行了 PCR 分子检测, 结果表明: 未转化植株显示阴性, 转基因植株均显示阳性(见图 5), 从而, 证实反义 waxy 基因已整合到基因组中。

3 讨论

3.1 水稻根癌农杆菌介导的遗传转化, 在多个实验室获得了转基因植株, 并已经建立了一套相应的操作系统。在多种转化受体材料的选择中, 已经证明成熟胚诱导的愈伤组织是较为理想的转化受体^[7]。在实际的操作过程中, 除了发现品种的基因型对转化频率有明显的差异外, 还初步发现外植体来源对转化频率也有差异。成熟胚比幼胚愈伤组织结构松散, 在其浸入农杆菌液时, 间隔内存有大量的农杆

由于被转的目的基因是由蜡质基因启动子引导下的由反义蜡质基因和 GUS 基因组成的融合基因, 因此, 转基因的愈伤组织或植株中是否存在该融合基因, 可通过 GUS 基因的组织化学检测来提供证据。为此, 取部分表现抗性的愈伤组织进行了 GUS 检测, 结果有 87% 的抗性愈伤组织显示兰色, 呈阳性反应。取部分 T₀ 转基因植株叶片进行 GUS 检测, 结果 80% 以上的转基因植株呈阳性反应, 来自空育 131、垦鉴稻 6 号、垦鉴稻 7 号、垦 01-612 品种的 T₀ 植株中分别有 87.7%、85.0%、78.9% 和 84.4% 的叶片显示兰色, 说明这些植株中已导入了该融合基因, 而且 GUS 基因得到表达(见图 4)。在空育 131 的转基因植株 T₁ 植株中的 GUS 检测中, 45.8% 的株系其种子的 GUS 分离比例符合 3:1 的分离规律, 显然, 被转的目的基因许多是以单一位点的方式

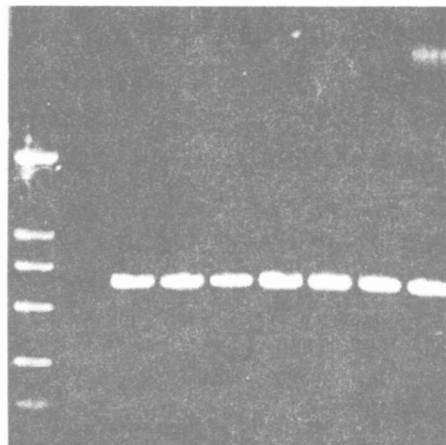


图 5 水稻转基因植株的 PCR 分子检测

菌, 共培养后, 如果用无菌水冲洗不彻底, 在筛选培养基上经常会出现农杆菌污染的现象。总体转化率比幼胚低^[12]。

3.2 蜡质基因是编码“结合在淀粉粒上的淀粉合成酶”的基因, 具有时空专一性表达的特点, 并且控制胚乳中直链淀粉的合成。利用反义蜡质基因的遗传转化, 将反义蜡质基因插入水稻, 通过它的表达, 实现降低水稻胚乳中蜡质基因的表达量, 达到降低直链淀粉含量的目的。

参考文献:

- [1] Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, et al.. Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Biotechnology, 1990, 8: 33-38.
- [2] Chan MT, Lee TM, Chang HH. Transformation of Indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33(5): 577-583.
- [3] Chan MT, Chang HH, Ho SL, et al.. Agrobacterium-media

黑龙江省粮食主产区主要作物品种种植情况分析

孙向东

(黑龙江省农科院谷物品质研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 介绍了黑龙江省四大粮食作物大豆、水稻、玉米、小麦的主产区分布及 2003 年主栽品种种植面积, 并分析了我省粮食作物主栽品种的发展趋势。大豆, 继续扩大高油品种面积, 适度发展高蛋白品种; 水稻, 在稳定目前播种面积的基础上提高食味品质; 玉米, 扩大工业用高淀粉、高油品种播种面积; 小麦, 发展优质强筋品种。

关键词: 黑龙江省; 粮食作物; 主栽品种; 种植面积

中图分类号: S 307.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2005)02-0012-03

Analysis on Planting Situation of Major Crop Varieties in Primary Grain Crop Production Region of Heilongjiang Province

SUN Xiang dong

(Cereal and Products Quality Supervisory Inspection and Test Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: The distribution of 4 major grain crops and sowing area of their varieties in 2003 were introduced and the development trend of major crop's varieties was analyzed. It is showed that the sowing area of high oil content soybean varieties is expected to enlarge continuously and the high protein content varieties to develop moderately. To advance flavor quality of rice under maintaining the present sowing area; to expand sowing area for industrial use of high starch and high oil content maize varieties; to develop strong gluten wheat varieties of high grade.

Key words: Heilongjiang province; grain crop; major sowing varieties; sowing area

* 收稿日期: 2004-04-03

基金项目: 黑龙江省科技厅“九五”攻关项目

作者简介: 孙向东(1965-), 男, 副研究员, 学士, 主要从事农产品品质和食品加工研究。

ted production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 491-506.

- [4] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al.. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. Plant Journal, 1994, 6: 271-282.

- [5] Rashid H, Yokio S, Tonyama K, et al.. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice[J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 727-730.

- [6] 沈革志, 张建军, 殷丽青, 等. 根癌农杆菌介导的 Ds 转座因子的水稻遗传转化[J]. 上海农业学报, 1998, 14(4): 7-12.

- [7] 刘永巍, 孟巧霞, 党永志, 等. 根癌农杆菌介导获得粳稻转基因植株研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(5): 41-44.

- [8] Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387-405.

- [9] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 1(6): 1349.

- [10] 赵恢武, 胡鸾雷, 林忠平. 植物遗传转化技术的研究进展[A]. 林忠平. 走向 21 世纪的植物分子生物学[C]. 北京: 科学出版社, 2000. 446-453.

- [11] Vain P, Worland B, Clarke M C, et al.. Expression of an engineered proteinase inhibitor (*Oryzacystatin*-1d86) for nematode resistance in transgenic rice plants[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 266-271.

- [12] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统建立[J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271.