

农杆菌介导北方粳稻转化体系的研究

刘双奇¹, 邹德堂¹, 孟 英², 卢泳全³, 卞景阳²

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所, 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院生物技术研究, 哈尔滨 150086)

摘要:通过农杆菌介导的方法将 *Bar-Bt* 基因(抗除草剂基因和抗虫基因构建在同一载体上的双基因)整合到北方优质粳稻龙稻 6 号、松粳 9 号等品种中; 分别以供试品种的幼胚和成熟胚为外植体诱导愈伤组织, 携带有 *Bar-Bt* 基因双元载体 PCAM BIA 1301 号的根癌农杆菌 EHA 105 为载体, *GUS* 基因的瞬时表达率为衡量指标, 对影响农杆菌介导的龙稻 6 号、松粳 9 号等品种的转化效率的主要因素进行了研究。结果表明: 农杆菌侵染愈伤组织的菌液浓度以 $D(600nm)=0.8\sim1.0$ 较为适宜, 最佳共培养时间为 2~3 d, 预培养时间为 5 d, 共培养培养基中添加 $100\mu mol\cdot L^{-1}$ 乙酰 苯酮的转化效率有明显提高。

关键词: 粳稻; 农杆菌; 遗传转化; *GUS* 瞬时表达率

中图分类号: Q933; S513 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)04-0006-03

Establishment of Transformation System Mediated by Agrobacterium Tumefaciens in Grain-oryza of North of China

LIU Shuang-qi¹, ZOU De-tang¹, MENG Ying², LU Yong-quan², BIAN Jing-yang²

(1. Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Biotechnological Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: With juvenile embryo of grain-oryza of North of China as explant, Agrobacterium tumefaciens strain EHA 105 carrying Tiplasmid PCAM BIA 1301 with *Bar-Bt* gene as vector, and the transient expression rate of *GUS* gene as measuring index, main factors that affected transformation efficiency of grain-oryza of North of China mediated by Agrobacterium tumefaciens were studied in this article. Results showed that the proper concentration of bacteria solution to infect callus was $D(600nm)=0.8\sim1.0$, the most suitable co-cultivation time was 2~3 days, pre-cultivation time was 5 days and addition of $100\mu mol\cdot L^{-1}$ Acetosyringone improved transformation efficiency considerably.

Key words: Japonica rice; Agrobacterium tumefaciens; genetic transformation; transient expression of *GUS* gene

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 它为人类提供了 1/3 以上的食物和能量。水稻也是虫害十分严重的大田作物, 稻螟虫、水稻负泥虫和稻飞虱危害最为严重, 而且水稻中抗虫资源十分贫乏, 加之田间各种杂草的蔓生, 我国北方水稻虫害和草害已成为生产中两大不可回避的焦点问题, 年经济损失达 5%~20%。

转基因技术为抗性品种的培育提供了一条新途径。目前, 农杆菌介导的水稻遗传转化体系已经成

为一个有效并初具规模的转化体系, 大多成功的都是籼稻品种, 粳稻起步较慢, 且基因共转化体系尚不完善, 本试验研究重点在于提高目的基因的遗传转化效率, 重点分析农杆菌介导转化北方优质粳稻转化体系中的几个重要参数。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻: (幼胚)成熟胚: 龙稻 6 号、松粳 9 号等粳稻品种由黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所提供。成熟胚: 吉丰 88、通粘 1 号等粳稻品种由吉林省农业科学院提供。

1.2 农杆菌菌株及质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 和质粒 PCAMBIA1301 由本实验室保存, 其中二元质粒载体 PCAMBIA1301 的 T-DNA 区含有 *ppt* 抗性基因和 β -葡萄糖苷酶 (*GUS*) 基因。在 *GUS* 基因的编码区有一个内含子, 因此, *GUS* 基因在植物中表达显著, 在细菌中则不能表达^[1]。

1.3 培养基和试剂

MS 培养基: 大量、微量 MS 维生素, 铁盐, L-Pro, 500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 2 mg·L⁻¹ 2, 4-D, 7 g·L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8~6.0; NBC 培养基: NB、100 μ mol·L⁻¹ 乙酰丁香酮 (AS), pH5.2; AAM 培养基: AA 盐和氨基酸、B₃ 维生素、500 mg·L⁻¹ 水解酪蛋白、36 g·L⁻¹ 葡萄糖、68.5 g·L⁻¹ 蔗糖、100 μ mol·L⁻¹ AS, pH 5.2; AS、利福平和卡那霉素、链霉素均由黑龙江省农业科学院生物技术研究所有保存, X-Gluc 购于上海生物工程有限公司。

1.4 组织培养

在无菌器皿中, 成熟胚或幼胚经过以下洗涤: 75% 酒精浸 1~2 min, 再用无菌水洗 2 次后, 20% 的次氯酸钠浸 30 min, 无菌水洗 4~5 次, 用无菌镊子把胚放在无菌滤纸上吸干, 接种与 MS 培养基上诱导愈伤组织, 一周后, 除去胚分生出的芽, 将愈伤置于 MS₂ (加 2 mg·L⁻¹ 2, 4-D) 培养基上继代培养, 以后每 2 周继代一次。经 2~4 次继代后即可选择嫩黄、颗粒状的胚性愈伤准备与菌共培养进行转化, 预培养 1~3 d。

1.5 农杆菌的培养及其介导的水稻转化

将携带有质粒 PCAMBIA1301 的农杆菌 EHA105, 在含有 30 mg·L⁻¹ 利福平、50 mg·L⁻¹ 卡那霉素、50 mg·L⁻¹ 链霉素的 LB 液体培养基中 (酵母粉 5 g; 蛋白胨 10 g; NaCl 10 g; pH 7.0; 总体积 1 L, 高压灭菌), 震荡培养至 D(600 nm)=0.6~2.0, 菌液在无菌的 50 mL 的离心管中以 400 r·min⁻¹×10 min 离心, 收集沉淀去上清, 再用 30 mL 的 NBC (MS₂+ AS 100 μ mol·L⁻¹) 液体培养基重悬, 将预先挑好的愈伤浸在菌液中 20~30 min 后, 再用无菌滤纸或吸水纸吸去多余的菌液 (无须进一步吸干), 置于 MS₀ 固体培养基 (可覆盖一层无菌滤纸) 上, 25℃ 暗培养 1~4 d。共培养后直接进行 *GUS* 瞬时表达检测并计算瞬时表达率^[2]。

GUS 瞬时表达率/ % = GUS^{+} 愈伤组织/ 总愈伤组织×100%。式中 GUS^{+} 指有 *GUS* 基因的表达。

根据实验预计, 设计以下 4 组实验: (1) 愈伤组织预培养天数: 共培养前的愈伤培养天数 1、2、3、4、5 d。(2) 菌液浓度: [D(600 nm)] 为 0.6、0.8、1.0、

1.5、2.0]。(3) 共培养天数: 1、2、3、4 d。(4) AS 的添加浓度: 0、100、200、300 μ mol·L⁻¹。

1.6 GUS 染色分析

根据 Jefferson^[3] 的方法进行。将共培养的愈伤组织浸入适量的 X-Gluc 染色液 (含 50 mmol·L⁻¹ Na₃PO₄ 缓冲液 (pH 7.0)、0.1% Triton X-100、20% 甲醇、0.5 mg·L⁻¹ X-gluc), 于 37℃ 保温过夜, 然后统计产生蓝斑和未产生蓝斑的愈伤组织数量。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织预培养天数对 GUS 瞬时表达率的影响

将连续继代的供试品种获得的愈伤组织转接到新鲜的 MS 培养基预培养 1~6 d, 再分别与农杆菌进行共培养, 3 d 后检测 *GUS* 基因的瞬时表达率。从表 1 可看出, 供试粳稻愈伤组织以预培养 5 d 获得的 *GUS* 瞬时表达率最高, 达 75%; 而少于 5 d 或高于 5 d, 其 *GUS* 瞬时表达率均比预培养 4 d 的数值低, 这表明 4 d 的预培养时间是愈伤组织活性的最佳时期。

表 1 愈伤组织预培养天数对 GUS 瞬时表达率的影响

预培养 天数/ d	总愈伤 组织数	GUS ⁺ 愈伤 组织数	GUS 瞬时 表达率/ %
1	75	41	54.7
2	62	36	58.1
3	68	45	66.2
4	76	52	68.4
5	78	57	73.1
6	67	43	64.2

2.2 菌液浓度对 GUS 瞬时表达率的影响

在农杆菌介导的遗传转化中, 菌液浓度的选择直接关系到转化的成败, 当菌液浓度过低的时候, 携带目的基因的农杆菌细胞数量少使转化效率降低; 反之, 如果农杆菌菌液浓度过高时, 一方面会造成细菌不充分影响后期培养, 另一方面由于营养不足造成死菌过多同样限制农杆菌的侵染能力。从表 2 中可以看出, 菌液浓度在 D(600 nm)<1.0 时 *GUS* 的瞬时表达率随菌液 D(600 nm) 增加而升高; 当 D(600 nm)=1.0~1.2 的时候, *GUS* 的瞬时表达率则维持一个相对稳定的水平, 当菌液浓度高的时候, *GUS* 的瞬时表达率的反而下降。

2.3 共培养时间对瞬时表达率的影响

经过预培养 4 d 的愈伤组织与农杆菌共培养 1~4 d 后, 进行 *GUS* 组织化学染色, 比较不同的共培养天数对瞬时表达率的影响 (见表 3)。从中可以看出 3 d 可以达到较高的瞬时表达率, 共培养时间长会导致农杆菌在愈伤组织表面过度繁殖使组织坏

死,降低转化效率;另一方面,也影响随后的抗性愈伤组织筛选时对农杆菌的抑制。一般情况下,共培养2~3 d,愈伤周围刚出现菌斑,愈伤组织仍处于嫩黄时较适宜进行细菌筛选。

表 2 不同浓度农杆菌下的 GUS 瞬时表达率

菌液浓度 [D(600nm)]	总愈伤 组织数	GUS+愈伤 组织数	GUS 瞬时 表达率/ %
0. 6	89	32	36. 0
0. 8	75	40	53. 3
1. 0	79	48	60. 8
1. 5	88	49	55. 7
2. 0	76	22	28. 9

表 3 共培养时间对 GUS 瞬时表达率的影响

共培养 天数/ d	总愈伤 组织数	GUS+愈伤 组织数	GUS 瞬时 表达率/ %
1	56	5	8. 9
2	62	35	56. 5
3	58	38	65. 5
4	49	6	12. 2

2.4 不同的 AS 浓度对 GUS 瞬时表达率的影响

由于单子叶植物缺少足够多的酚类物质来激活农杆菌的侵染能力,因此,在转化过程中必须人为地添加一些酚类物质以提高转化效率。本试验就共培养中添加不同的 AS 浓度对 GUS 瞬时表达率的影响进行了比较(见表 4)。从中可以看出,在不添加

表 4 共培养时不同的 AS 浓度对 DUS 瞬时表达率的影响

AS 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	总愈伤 组织数	GUS+愈伤 组织数	GUS 瞬时 表达率/ %
0	83	0	0
100	84	56	66. 7
200	78	51	65. 3
300	95	63	66. 3

AS 的情况下, GUS 瞬时表达率为 0,转化基本上是不可能实现的,当浓度达到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GUS 瞬时表达率迅速提高,高于 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,瞬时表达率差异并不显著,说明添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 就可以达到理想的效果。

3 结论与讨论

农杆菌介导的外源基因的转化是细胞分子水平的相互作用,在这个遗传转化体系中,任何影响细胞转化能力的因素都有可能对外源基因的整合转化产生影响,如不同的碳源、不同的外植体类型、载体类型、农杆菌菌株以及受体组织的类型等均是影响转化的因素。

GUS 基因作为一种遗传转化的标记基因,一般 GUS 瞬时表达率与转化率成平行关系,即瞬时表达率越高,转化效率也越高^[4]。因此 GUS 瞬时表达率是衡量转化效率的一个重要依据,本试验通过 GUS 瞬时表达率来衡量各个影响北方优质粳稻遗传转化的因素进行了比较,从而确定了几个适宜遗传转化体系的重要参数:(1)农杆菌侵染愈伤组织的菌液浓度以 $D(600 \text{ nm})=0.8 \sim 1.0$ 较为适宜;(2)最佳共培养时间为 2 d;(3)预培养时间为 5 d;(4)共培养培养基中添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的转化效率有明显提高。

参考文献:

[1] 程继鸿,王鸣,何玉科,等. 植物抗虫基因工程研究进展[J] . 北京农学院学报,2000,15(1): 56-58.
[2] 朱玉贤. 植物基因的克隆与转化研究进展[J] . 河北科技大学学报,1999,20(2): 5-9.
[3] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants; the GUS gene fusion system[J] . Plant Mol Rep., 1987, 5: 387-405.
[4] 王关林,方宏筠. 植物基因工程的原理与方法[M] . 北京: 科学出版社,1998.

第十九届中国哈尔滨国际经济贸易洽谈会隆重召开

2008 年 6 月 15 日第十九届中国哈尔滨国际经济贸易洽谈会(哈洽会)在哈尔滨国际会展体育中心拉开帷幕。本届哈洽会由国家商务部、国家贸促会、黑龙江省政府、浙江省政府、哈尔滨市政府共同主办,由联合国工业发展组织及 12 个国家和地区的政府机构和商会社团组织参与协办。有 59 个国家和地区的近12 000 名客商、85 家世界 500 强企业及 559 家国际知名大企业等诸多中外客商参会参展。展会期间还将举办活动日、商务日和推介日等重要系列活动。一些重大国内外经济技术合作项目将在展会上签约。

黑龙江省农业科学院在哈洽会设三个标准展位,全院共有 28 个研究分院(所)参加,征集各类展品 280 余件。其中农作物新品种 195 个,主要包括玉米、大豆、水稻、小麦、杂粮、马铃薯等;蔬菜品种 22 个;农化品种 32 种,主要包括复混肥、壮秧剂、叶面肥、种衣剂等;各类农副加工产品 20 种,主要包括果酒、葡萄酒、大米、玉米色拉油、蜂蜜产品、杂粮产品等;其他产品 8 个。各分院(所)宣传单、挂图、手册 10 000 多份。