



金梦如,王帅,于春生,等. 垦鉴稻 10 号遗传转化体系的建立[J]. 黑龙江农业科学,2020(7):15-20.

垦鉴稻 10 号遗传转化体系的建立

金梦如¹,王 帅¹,于春生²,孙冬梅¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命学院,黑龙江 大庆 163319;2. 林口县农技推广中心,黑龙江 林口 157600)

摘要:农杆菌介导的遗传转化技术,可优化水稻遗传转化体系。为研究农杆菌介导的遗传转化,以垦鉴稻 10 号去壳种子作为试验材料,研究了 75%乙醇、0.1%升汞和 5%次氯酸钠不同配比及处理时间消毒后的效果;利用试验筛选的最佳消毒条件,分别以 MS 培养基、B₅培养基、N₆培养基以及 NMB 培养基附加不同浓度 2,4-D,筛选诱导愈伤的最佳培养基,并进行愈伤组织的转化。结果表明:诱导愈伤的最佳消毒处理组合为 75%酒精 1 min+0.1%升汞 10 min+5%次氯酸钠 4 min;经过方差分析 NMB 培养基附加 2.5 mg·L⁻¹ 2,4-D 对该品种愈伤组织的诱导效果明显优于其他培养基,诱导的愈伤组织大而洁白,硬度适中。将含 p3300-ubi-BhGo-S1-Tnos 重组子的根癌农杆菌与愈伤组织共同培养,经检测,得到转化成功的愈伤组织。

关键词:水稻;成熟胚;愈伤组织;转化

现代分子生物学和植物组织培养技术发展促进了转基因植物的产生。在农业上主要是利用 DNA 重组技术将外源 DNA 导入农作物,从而改造作物的遗传信息,建立快速、高效、稳定的转化系统^[1]。随着转基因技术的发展,转基因新品种不断出现,目前我国有多种转基因植物已经或即将进入商业化生产,其中包括保鲜西红柿、抗病马铃薯、抗虫棉等,同时转基因作物的种植面积也在不断扩大。水稻是世界上最重要的粮食作物之一,全球约 1/3 以上的人口以稻米为主食。组织培养及基因工程技术目前已经被广泛应用于水稻育种研究,并取得了显著成果。为了把水稻组织培养的研究结果应用于遗传改良和育种实践,科学工作者作了大量试验,育成了一批批优质的新品种,取得了良好的经济效益^[2-3]。

现代生物技术育种的过程中,愈伤组织经常作为外源基因的受体,因此,愈伤组织质量的好坏及其分化植株能力的高低,对水稻基因工程的进展有着极其重要的作用,也影响着水稻种质资源的创新^[4-8]。在改善愈伤组织质量和提高植株再生能力方面,科学工作者进行了大量研究并取得

了一定的成果^[9-10]。本次试验选取由黑龙江八一农垦大学水稻中心育成,对稻瘟病有一定抗性,具有耐冷性强等优势垦鉴稻 10 号成熟种子为试验材料,探讨了不同处理对垦鉴稻 10 号水稻形成愈伤组织的影响,以及抗性质粒的转化,为提高水稻遗传转化效率提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试水稻垦鉴 10 号由黑龙江八一农垦大学水稻研究室提供。

1.1.2 试验菌种 含有 p3300-ubi-BhGolS1-Tnos 重组子的根癌农杆菌由实验室保存。

1.1.3 主要试剂 75%酒精,0.1%升汞,5%次氯酸钠,MS 培养基,B₅培养基,N₆培养基,NMB 培养基(N₆大量元素,MS 微量元素,B₅有机成分),2 mg·L⁻¹ 2,4-D 溶液,X-Gluc 染色液:50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0)、10 mmol·L⁻¹ EDTA、0.1%(V/V) Triton X-100、2 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾、2 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾和 5%(m/V)的 5-溴-4-氯-3-吡啶-葡萄糖苷酸(X-Gluc)。

1.2 方法

1.2.1 成熟水稻种子的消毒处理 水稻成熟种子脱去颖壳,避免剥伤种胚。去除有斑点无胚以及背部有褐纹,胚不完整或发黑的种子;挑选粒大、有胚的饱满种子,进行消毒处理,处理方法见表 1,处理完毕后,用无菌水冲洗 3~5 次,再用已

收稿日期:2020-01-12

基金项目:黑龙江农垦总局项目(HKKY190403);大庆市指导项目(zd-2017-63)。

第一作者:金梦如(1995-),女,在读硕士,从事微生物学研究。E-mail:907401509@qq.com。

通信作者:孙冬梅(1970-),女,博士,教授,从事应用微生物研究。E-mail:sdmlzw@126.com。

灭菌的吸水纸将种子表面的水分吸干,待用。

表 1 消毒液不同配比及时间组合

Table 1 Different formulations and time combinations of disinfectant

序号 Serial number	75%酒精 75% alcohol/min	0.1%升汞 0.1% mercuric chloride/min	5%次氯酸钠 5% sodium hypochlorite/min
1	0.5	8	6
2	0.5	10	0
3	0.5	10	4
4	1	8	6
5	1	10	0
6	1	10	4
7	3	8	6
8	3	10	0
9	2	3	4

1.2.2 水稻愈伤组织的诱导 将已灭菌的培养基在无菌操作台中分别倒入平皿中,待培养基冷却凝固后,在无菌操作台中将已处理完的种子放到培养基,每 150 粒种子平均放置到 6 个培养皿中,试验设置 3 次重复。摆放完毕后,用封口膜将培养皿包好,做好标记并放入恒温箱中培养 14 d,温度设定在 27 ℃^[11]。

将配制完成的 4 种培养基:MS, B₅, N₆ 以及 NMB 培养基附加 2 mg·L⁻¹ 2,4-D, 分别倒入平皿中,待冷却凝固后,将 125 粒消毒(采用上述优化后的组合)后的种子,平均放置到 5 个培养皿内,试验设置 3 次重复,摆放完毕后,用封口膜将培养皿包好,做好标记并放入恒温箱中培养,将温度设定在 27 ℃^[12]。

利用最优培养基添加不同浓度 2,4-D 诱导愈伤组织,筛选出最优 2,4-D 浓度,2,4-D 添加量为 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 和 3.5 mg·L⁻¹。灭菌后分别倒入平皿中,待冷却凝固后,将消毒后的种子放置到培养皿中,试验设置 3 次重复。摆放完毕后,用封口膜将培养皿包好,并做好标记放在培养箱中 27 ℃培养。

1.2.3 根癌农杆菌的培养 活化:将 p3300-ubi-BhGolS1-Tnos 重组子的农杆菌菌株在 YEB+ Kan (50 mg·L⁻¹) + Rif (25-50 mg·L⁻¹) +

Gent(50 mg·L⁻¹)的固体培养基上 28 ℃暗培养 2~3 d。挑单菌落接种于 10 mL YEB + Kan(50 mg·L⁻¹) + Rif (25 ~ 50 mg·L⁻¹) + Gent(50 mg·L⁻¹)液体培养基中,28 ℃暗培养约 24 h。

扩增:用含抗生素的 YEB 培养基 YEB + Kan(50 mg·L⁻¹) + Rif (25 ~ 50 mg·L⁻¹) + Gent (50 mg·L⁻¹)再活化一次,菌液与培养基的比为 1:50,28 ℃过夜培养至 OD₆₀₀ 约 0.8。

1.2.4 农杆菌的侵染、共培养与筛选 将农杆菌菌液离心收集菌体,用 MS 液体培养基重悬菌体,加入乙酰丁香酮(100 μmol·L⁻¹)将生长状态良好的愈伤组织放入含农杆菌的液体中,28 ℃振荡培养 30 min。

将愈伤组织转到无菌纸上,吸干菌液,接到加有乙酰丁香酮(100 μmol·L⁻¹)的继代培养基中培养 2 d,直到农杆菌在表面长出。

待愈伤组织表面长出农杆菌后用 1%的甘露醇进行洗脱,28 ℃震荡 10 min,洗 3~4 次。再用无菌水 28 ℃震荡 10 min,洗 3~4 次后,用加 100 mg·L⁻¹ 羧苄的无菌水震荡 10 min,洗 3~4 次。吸干表面液体,接入含有羧苄青霉素的继代培养基中。

培养 7 d 后转入加有 PPT 的继代培养基中筛选抗性愈伤。经 3 代筛选后留下生长旺盛的抗性愈伤。

1.2.5 外源基因的瞬时表达检测 参照 Jefferson 的 GUS 检测方法,略作改进。转化后的愈伤组织中 GUS 瞬时表达的检测:取共培养两天的少量愈伤组织块于微量离心管中,加入 100 μL X-Gluc 染色液后,在 37 ℃下放置 12 h 左右,观察染色情况。

1.2.6 数据分析 该试验所有数据使用 SPSS Statistics 23.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对愈伤组织的影响

将种子消毒处理后接种到培养基上,培养 15 d后可观察到有愈伤组织长出。由表 2 可知,6 号处理,即 75% 酒精 1 min + 0.1% 升汞 10 min+5%次氯酸钠 4 min 为最佳的消毒处理组合,出愈率达到 73.3%,与其他组相比显著提高,且染菌率为零(图 1)。

表 2 不同消毒处理所得愈伤组织
Table 2 Callus from different disinfection treatments

编号 Serial number	种胚数/个 Numbers of embryos	愈伤数/个 Numbers of callus	出愈率 Recovery rate/%	染菌率 Pollution rate/%
1	150	80±3 d	53.3	16.7
2	150	81±2 d	54.0	50.0
3	150	89±5 c	59.3	33.3
4	150	90±4 c	60.0	0
5	150	96±5 b	64.0	33.3
6	150	110±6 a	73.3	0
7	150	84±4 d	56.0	0
8	150	74±3 e	49.3	16.7
9	150	56±2 f	37.3	0

注: 染菌率按种胚数计算。
Note: The infection rate is calculated according to the number of embryos.



图 1 最佳消毒处理组合得到的愈伤组织
Fig. 1 Callus from the best combination of disinfection treatments

2.2 不同培养基对愈伤组织的影响

将种子按 6 号消毒方案消毒处理后, 分别接种到 4 种培养基上, 再添加 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2,4-D, 培养 12 d 后可观察到有愈伤组织长出。由表 3 可知, 不同培养基对愈伤组织的出愈率有影响。NMB 培养基出愈率最高, 达到 75.2%, 小愈伤数最少, 具有显著性, 大愈伤新鲜致密, 褐化较少(图 2)。

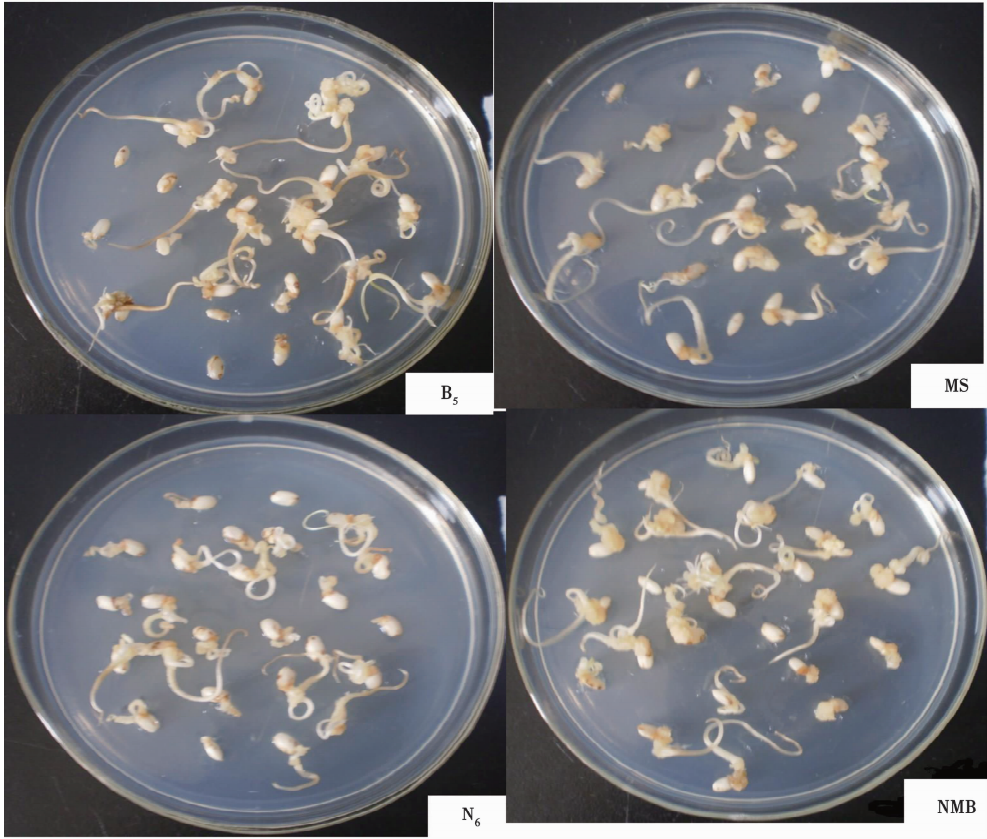


图 2 4 种培养基中的愈伤组织状态
Fig. 2 Callus status in four kinds of media

表 3 不同培养基中的愈伤组织

Table 3 Callus in different media

培养基	种胚数/个	愈伤数/个	愈伤大/小	褐化数
Medium	Numbers of embryos	Numbers of callus	Number of big/small callus	Browning number
B5	125	87±3	25/62 a	27
MS	125	93±4	33/60 a	12
N6	125	94±2	45/49 b	13
NMB	125	94±4	49/45 c	10

2.3 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织的影响

选用 NMB 培养基附加如表 4 中不同浓度的 2,4-D,比较各浓度下的愈伤组织形成情况,试验数据证明,虽然浓度在 2 mg·L⁻¹ 与 2.5 mg·L⁻¹ 条件下没有显著性,但是在浓度为 2.5 mg·L⁻¹ 的条

件下愈伤数最多,出愈率达到 79.1%,愈伤块大且有根,褐化较少。2 mg·L⁻¹ 的条件下出愈率 72.4%。因此,2,4-D 浓度为 2.5 mg·L⁻¹ 对愈伤组织形成是最有利的(图 3)。

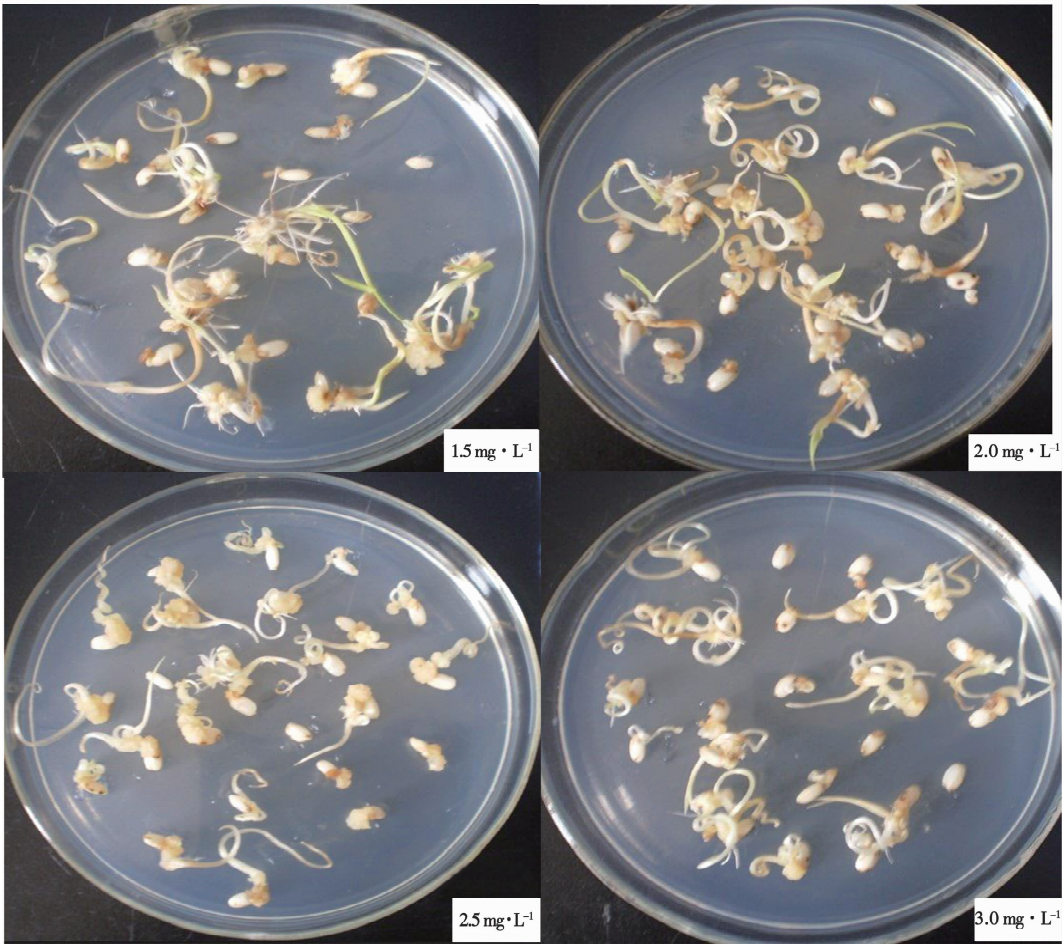


图 3 2,4-D 浓度在 4 种水平下的愈伤组织

Fig. 3 Callus at 2,4-D concentrations at four levels

2.4 外源基因的瞬时表达检测

采用 GUS 检测法。GUS 基因是 β-葡萄糖苷

酸酶基因,编码 β-葡萄糖苷酸酶。β-葡萄糖苷酸酶是一个水解酶,以 β-葡萄糖苷酸酯类物质为底

物,其反应产物可用组织化学法检测出来。以 X-Gluc 作为反应底物,将被检材料用含有底物的缓冲液浸泡。若组织细胞发生了 *Gus* 基因的转化,并表达出 *Gus*,在适宜的条件下,该酶就可将 X-Gluc 水解生成蓝色产物。这是由其初始产物

经氧化二聚作用形成的靛蓝染料,它使具 *Gus* 活性的部位或位点呈现蓝色,可通过肉眼或显微镜观察到,且在一定程度下根据染色深浅可反映出 *Gus* 活性。

表 4 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织的影响

Table 4 Effects of different 2,4-D concentrations on callus

浓度	愈伤数/个	愈伤大/小	褐化数	状态描述
Concentration	Numbers of callus	Number of big/small callus	Browning number	State description
1.0	58±2 c	18/40	0	无芽多根
1.5	57±3 c	28/29	3	多芽多根
2.0	70±5 ab	36/34	2	多芽多根
2.5	76±4 a	41/35	2	有根
3.0	59±3 c	20/39	2	有根
3.5	66±3 b	19/47	5	有根

图 4 表示被染成蓝色的愈伤组织,箭头所指处颜色较深,其他愈伤组织块上染色部位少而浅,

但大多数愈伤组织均被染色,试验结果证明转化成功,且转化率为 82%。



图 4 GUS 染成蓝色的愈伤组织

Fig. 4 GUS stained with blue callus

3 结论与讨论

水稻胚性愈伤组织的诱导是水稻遗传转化中的重要环节^[11]。胚性愈伤的状态直接影响着遗传转化效率。所以良好生长状态的胚性愈伤的数

量是提高转化效率的关键。本试验完成了对垦鉴稻 10 号愈伤组织培养过程中的外植体消毒,基本培养基的筛选与最适 2,4-D 浓度的选择工作,找出了垦鉴稻 10 号品种水稻成熟胚诱导高质量愈

伤组织的影响因素,以及通过愈伤组织进行转基因试验并且转化成功。试验得出:最佳消毒组合为 75%酒精 1 min,0.1%升汞 10 min,5%次氯酸钠 4 min;最适培养基为 NMB 培养基;愈伤组织诱导的最佳 2,4-D 浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。试验结果与廖鹏飞等^[14]的研究有相同之处,即通过试验证明 NMB 培养基为最适培养基;而 2,4-D 浓度对愈伤组织的诱导结果略有不同,其可能原因是本试验的垦鉴稻 10 号对 2,4-D 浓度更敏感。因此,在诱导不同品种愈伤组织时应根据实际情况选择 2,4-D 浓度。从而筛选出性能更优,转化体系更高效的水稻体系,为转基因水稻苗在以后的农业生产中的应用提供可靠地科学依据。

参考文献:

- [1] 张欣,付亚萍,周君莉,等.水稻规模化转基因技术体系构建与应用[J].中国农业科学,2014,47(21):4141-4154.
- [2] 张丽,宋玉霞,巩榴,等.农杆菌介导的马铃薯转化研究进展[J].分子植物育种,2015,13(7):1660-1667.
- [3] 苏振华,张俊华,张泽鑫,等.农杆菌介导的甜椒遗传转化体系的建立[J].江西农业学报,2019,31(6):9-15.
- [4] 高璐,薛永来.农杆菌介导的水稻快速高效基因转化系统[J].江苏农业科学,2019,47(4):39-42.
- [5] 朱克明,陶慧敏,徐硕,等.水稻愈伤分化和再生研究进展[J].种子,2016,35(11):55-59.
- [6] 王兴春,方红明,徐惠兰.提高籼稻优质米品种成熟胚培养力的研究[J].种子,2001,113(1):5-8.
- [7] 王萍,李杰,王恩旭,等.水稻成熟胚愈伤组织的诱导与增殖研究[J].种子,2008(5):17-19.
- [8] 刘香玲,王玉珍,罗景兰.水稻成熟胚愈伤组织的诱导和分化因素的研究[J].山东农业科学,2005,37(5):7-9.
- [9] 沈娟,徐利娟,张启军,等.不同接种方式对水稻成熟胚组织培养的影响[J].江苏农业科学,2012,40(8):67-69.
- [10] 郑责朝,胡事君.提高水稻愈伤组织植株再生能力几种方法的评价[J].杂交水稻,2005,20(2):54-57.
- [11] Karthikeyan A, Pandian S T K, Ramesh M. High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2009, 15(4): 371.
- [12] 朱克明,陶慧敏,徐硕,等.水稻愈伤分化和再生研究进展[J].种子,2016,35(11):55-59.
- [13] Ge X, Chu Z, Lin Y, et al. A tissue culture system for different germplasms of indica rice [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(5): 392-402.
- [14] 廖鹏飞,赵君幸,雷发扬,等.不同基本培养基和激素对籼稻成熟胚愈伤组织诱导的影响[J].湖北农业科学,2012,51(18):4121-4125.

Establishment of Genetic Transformation System in Kenjiandao No. 10

JIN Meng-ru¹, WANG Shuai¹, YU Chun-sheng², SUN Dong-mei¹

(1. College of Life Sciences, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Linkou Agricultural Technology Extension Center, Linkou 157600, China)

Abstract: *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology can optimize rice genetic transformation system. In order to study *agrobacterium*-mediated genetic transformation, taking Kenjiandao No. 10 as the experimental materials, the effect of different matching and treatment time on the mature embryo callus were studied using 75% alcohol, 0.1% mercuric chloride and 5% sodium hypochlorite as disinfectants. Use MS, B₅, N₆ and NMB as selective medium and add different concentrations of plant hormones to find out the best medium to inductive callus. The results showed that, the best callus induction disinfection treatment combination was: 75% alcohol 1 min + 0.1% mercuric chloride 10 min + 5% sodium hypochlorite 4 min; after analysis of variance NMB medium with $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D was better than the other medium in callus induction, and the induced callus were larger with white color and moderate hardness. After cultivating *Agrobacterium tumefaciens* plasmid with vector p3300-ubi-BhGolS1-Tnos and callus together, the successful transformation of callus were obtained.

Keywords: rice; mature embryo; callus; transformation