

NaCl 筛选法获得无标记耐盐转基因水稻的高效转化技术研究

赵 潇,罗园园,赵 艳

(浙江工商大学 食品与生物工程学院,浙江 杭州 310012)

摘要: NaCl 筛选法是培养无标记耐盐转基因水稻的有效方法。以中华 11、秀水 11、春江 06 这 3 个粳稻品种成熟胚愈伤组织为材料,以 SKC1 为目标基因,研究 NaCl 筛选条件下,热激与液体共培养对农杆菌介导耐盐基因转化水稻效率的影响。结果显示,热激处理和液体共培养都能提高耐盐基因对水稻的转化率,其中,热激处理最高转化提高率达到 46.2%,液体共培养后最高转化提高率达到 60.7%。

关键词: 水稻; NaCl 筛选; 热激; 液体共培养; 转化效率

中图分类号: Q943; S511.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)01-0063-05

Study on NaCl Screening to Obtain Marker-free and High Effective Salt-tolerant Transgenic Rice

ZHAO Xiao, LUO Yuan-yuan, ZHAO Yan

(College of Food Science, Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: It is an effective method to use NaCl selecting to generate marker-free salt-tolerant transgenic rice. We used the three japonica rice cultivar (ZhongHua11, Xiushui11, Chunjiang06) mature embryos callus as materials, SKC1 as the target gene to study that on the conditions of screening NaCl, heat shock treatment and liquid co-culture of Agrobacterium-mediated gene transfer salt-tolerant rice efficiency. The results showed that heat shock and liquid co-culture of rice could enhance the efficiency of salt tolerance gene transfer. Among them, the heat shock treatment increased the maximum efficiency of gene transfer was 46.2%, while the liquid co-culture increased the highest efficiency of gene transfer was 60.7%.

Key words: Rice; NaCl screening; Heat shock; Liquid co-culture; The efficiency of gene transfer

在植物遗传转化过程中,通常需要利用抗性选择标记基因来筛选获得转化成功的细胞,目前在水稻转化中广泛使用的有 *hpt*、*nptII*、*bar* 等除草剂抗性标记基因。然而,此类筛选剂对食品和生态环境存在着巨大的潜在危害,已经成为影响转基因水稻商品化应用的主要障碍。Zhu 等^[1]报道,在农杆菌介导耐盐基因转化日本晴过程中直接采用 200 mmol/L 的 NaCl 作为筛选剂,不采用任何抗性选择标记基因能成功获得转基因水稻植株,为培育无标记耐盐转基因水稻提供了有效新途径。

随着农杆菌介导转化技术的成熟,转化效率的提高逐渐成为进一步扩大农杆菌介导转化技术应用

的重要基础。Yukoh 等^[2]将水稻幼胚愈伤组织在 43℃ 加热 30 min,再冰浴 1 min 后,农杆菌介导转化效率提高显著;Kenjiro^[3]报道,农杆菌介导转化日本晴过程中,在共培养过程中使用特殊的滤纸法对愈伤组织进行液体培养,使转化效率提高了 5 倍。

SKC1 (Shoot K^+ concentration) 是一个水稻耐盐相关的数量性状基因^[4]。*SKC1* 基因的作用机理是当水稻受到盐胁迫时,稻株的地上部(叶、茎等)会积累大量的钠离子,而 *SKC1* 则能够把地上部分过量的钠离子回流到根部,从而减轻钠离子毒害,增强水稻耐盐性,在作物抗盐性分子育种上将具有广泛的应用前景。本试验以 *SKC1* 为目标基因,研究采

收稿日期:2011-11-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871511;30771317);农业部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX0810-003;2009ZX08001-022B);国家“863”计划资助项目(2006AA10Z1A9);中国博士后基金资助项目(20090450477)

作者简介:赵 潇(1987-),女,浙江东阳人,在读硕士,主要从事细胞工程与基因工程研究。

通讯作者:赵 艳(1970-),女,河北临漳人,教授,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。

用 NaCl 筛选时,热激和液体共培养处理对水稻转化效率的影响。

1 材料和方法

1.1 水稻材料

供试材料为中华 11、秀水 11、春江 06 等 3 个粳

稻品种当年收获的成熟种子。

1.2 基因

携带耐盐基因 *SKC1* 的质粒 *PKCC* 的农杆菌 LBA4404,由林鸿宣所领导的中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究组惠赠。*PKCC* 基因载体结构如图 1 所示。

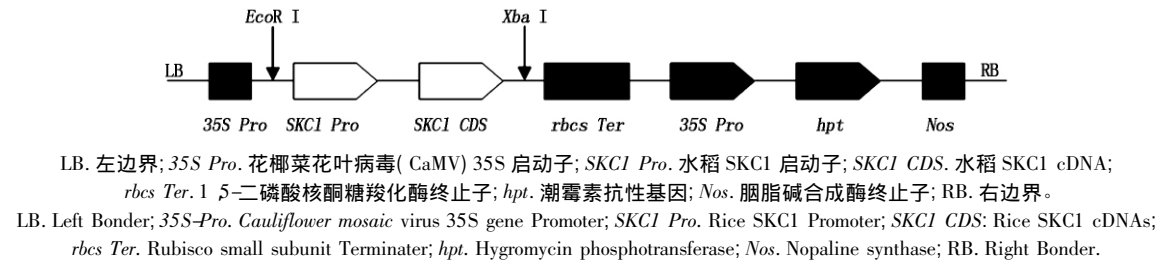


图 1 *PKCC* 基因载体示意图
Fig. 1 The schematic gene construct of *PKCC*

1.3 培养基

试验所需的培养基见表 1 和表 2。

表 1 细菌培养基

Tab. 1 Bacterial culture mediums

培养基 Culture medium	成分 Component
YEB	5 g/L 牛肉浸膏、1 g/L 酵母膏、5 g/L 蛋白胨 5 g/L 蔗糖、2 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、pH 7.4
AAM	AA 大量元素、氨基酸、MS 微量元素、铁盐 维生素、肌醇、0.5 g/L 水解酪蛋白、 68.5 g/L 蔗糖、36 g/L 葡萄糖、pH 5.2

1.4 水稻愈伤组织培养

在无菌条件下,用 70% 乙醇浸泡已脱壳种子 1 min,用蒸馏水洗涤 3 次,再用 30% NaClO(每 500 mL 加入 1 滴吐温 80)浸泡 15 min,用蒸馏水洗涤 3

次,重复 1 次;采用不含吐温 80 的 30% NaClO,用无菌滤纸吸干种子表面水分,无菌条件下接种到诱导培养基上,在 28℃ 光照条件下诱导愈伤组织;待愈伤长出后,挑选致密、状态佳的愈伤组织进行继代培养。

1.5 农杆菌介导法转化水稻

1.5.1 农杆菌的培养 取携带耐盐基因质粒 *PKCC* 的农杆菌株 LBA4404 菌保 20 μ L 接种于 2 mL 液体 YEB 培养基(含有 50 mg/L 硫酸卡那霉素和 50 mg/L 利福平)的小锥形瓶中,28℃ 过夜振荡培养。再取 200 μ L 小瓶中菌液接种于 50 mL 双抗 YEB 培养液中再次过夜振荡培养。9 000 \times g 离心 10 min,收集菌体,悬浮于等体积的液体 AAM 培养基中(内含终浓度为 100 μ mol/L 的乙酰丁香酮)以备转化之用。

表 2 水稻组织培养基

Tab. 2 Rice tissue culture mediums

培养基 Culture medium	成分 Component
诱导、继代	NB 培养基 + 2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸, pH 5.8
常规共培养	诱导培养基 + 10 g/L 葡萄糖 + 100 μ mol/L 乙酰丁香酮, pH 5.2
液体共培养	诱导培养基 + 5 g/L 葡萄糖 + 0.1 g 半胱氨酸 + 100 μ mol/L 乙酰丁香酮, pH 5.2
筛选培养基	诱导培养基 + 300 mg/L 羧苄青霉素 + 50 mg/L 潮霉素, pH 5.8
分化培养基	NB 基本培养基 + 3 mg/L 6-苄氨基嘌呤 + 0.5 mg/L 萘乙酸 + 13 g/L 山梨醇 + 50 mg/L 羧苄青霉素, pH 5.8
MS 基本培养基	MS 大量、MS 微量、B5 有机、Fe-EDTA、30 g/L 蔗糖 2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸、300 mg/L 水解酪蛋白、100 mg/L 肌醇 3 g/L 植物凝胶, pH 5.8
生根培养基	1/2 MS 基本培养基 + 20 g/L 蔗糖 + 2 mg/mL 多效唑

1.5.2 农杆菌转化

1.5.2.1 农杆菌转化 挑选生长旺盛的愈伤组织,放入 OD₆₀₀ 值为 0.3 的 AAM 菌悬液中浸染,不断振荡 20 min 后,倒掉菌液,用含有 300 mmol/L 的羧苄青霉素清洗愈伤 5 次,倒掉废液,将愈伤置于无菌滤纸上吹干。再将表面干燥的愈伤接种在铺有一层无

菌滤纸的共培养培养基上,28℃ 暗培养 3 d 后,移至筛选培养基上。

1.5.2.2 热激法 挑选生长旺盛的愈伤组织,移至含适量无菌水的无菌试管中,43℃ 水浴 30 min,冰浴 1 min,然后放入 OD₆₀₀ 值为 0.3 的 AAM 菌悬液中浸染,不断振荡 20 min 后,倒掉菌液,用含有 300

mmol/L 的羧苄无菌水清洗愈伤 5 次,倒掉废液,将愈伤置于无菌滤纸上吹干。再将表面干燥的愈伤接种在铺有一层无菌滤纸的共培养培养基上,28℃暗培养 3 d 后,移至筛选培养基上。

1.5.2.3 液体共培养处理 挑选生长旺盛的愈伤组织,放入 OD₆₀₀ 值为 0.04 的 AAM 菌悬液中浸染,不断振摇 1.5 min 后,将愈伤组织移至事先加入 5 mL 滤纸法液体培养基的带三层滤纸的培养皿上,28℃暗培养 3 d 后,用含有 300 mmol/L 的羧苄无菌水清洗愈伤 5 次,倒掉废液,将愈伤置于无菌滤纸上吹干,然后移至筛选培养基上。

1.6 NaCl 筛选浓度的确定

为了确定转化筛选时合适的 NaCl 浓度,需要比较不同浓度 NaCl 对水稻愈伤生长的影响,绘制 NaCl 浓度梯度对愈伤组织增重率之间的生长曲线,根据前期研究结果^[5]确定中华 11 的 NaCl 筛选浓度为 200 mmol/L,秀水 11 和春江 06 为 250 mmol/L。

1.7 抗性愈伤组织获得、分化、幼苗生根及移栽

将愈伤组织转接于含盐筛选培养基筛选 2 轮,每轮 15 d,然后挑选抗性愈伤,转入分化培养基上,28℃下光照培养 30 d 左右,待其出现绿点;当绿点长成小苗时,将小苗转接于生根培养基上,28℃下光照培养 3~4 周,然后将苗移栽至温室或大田。

1.8 抗性植株的分子检测

按 Edwards^[6] 等方法提取待测的叶片总 DNA。PCR 体系为 25 μL,包括 5 μL 模板,0.1 μL Tag 酶,2.5 μL dNTPs,2.5 μL 10×缓冲液,1 μL 引物。PKCC 基因引物 P1 序列为 5'-CCTTGCGCAAT-TCTTTGGCTC-3';引物 P2 序列为 5'-CGTTCCTT-GGGTTTTCTCACAC-3';可扩增出大小 1.5 kb 的

DNA 特异性片段。PCR 反应参数条件:94℃预变性 4 min;94℃变性 50 s,55℃复性 0.5 min,72℃延伸 1.5 min,36 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物加 5 μL 上样缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶上以 140 V 电压电泳 30 min,然后在紫外灯下观测拍照。

1.9 数据处理

根据 *hpt* 基因序列设计引物对转基因植株进行 PCR 分析,检测基因的转化情况。转化频率各指标的统计参照文献[7]。

绿苗分化率 = 分化绿苗数 / 感染愈伤组织数 × 100%

假阳性率 = (绿苗数 - PCR 阳性植株数) / 绿苗数 × 100%

转化率 = PCR 阳性植株株数 / 感染愈伤组织数 × 100%

每组实验重复 3 次取平均值,用 T-检验统计分析处理和对照的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 热激处理对 NaCl 筛选耐盐基因 *SKC1* 转化水稻效率的影响

采用对 NaCl 筛选法,转化 *SKC1* 基因时,中华 11、秀水 11 和春江 06 这 3 个粳稻品种的绿苗分化率和转化率都存在一定差异(表 3)。其中,春江 06 的绿苗分化率最高,达到 43.22%;秀水 11 次之,分化率 39.91%;而中华 11 分化率最低只有 14.71%。秀水 11 和春江 06 的转化率相近,分别是 32.06% 和 32.03%;而中华 11 的转化率明显偏低,只有 11.98%。可见,农杆菌的转化效率也受到转化受体基因型的影响。

表 3 热激处理对耐盐基因 *SKC1* 转化水稻的影响

Tab. 3 Effect of heat shock treatment on rice transformation rate

品种 Varieties	感染数愈伤数 No. of infected callus	绿苗数 No. of green plant	PCR 阳性植株数 No. of PCR positive plant	绿苗分化率/% Differential rate of green plant	假阳性率/% Rate of false positives	转化率/% Rate of transformation
中华 11	对照	95.67 ± 0.32	14.33 ± 0.41	11.67 ± 0.40	14.71 ± 0.09	18.57 ± 0.09
	处理	129.00 ± 0.21	31.00 ± 0.26	22.33 ± 0.16	24.01 ± 0.12 a	26.66 ± 0.28
秀水 11	对照	99.33 ± 0.22	40.00 ± 0.28	32.00 ± 0.25	39.91 ± 0.07	19.62 ± 0.19
	处理	118.00 ± 0.32	57.67 ± 0.29	49.00 ± 0.30	49.24 ± 0.04 a	15.12 ± 0.10
春江 06	对照	105.67 ± 0.08	45.67 ± 0.06	33.67 ± 0.05	43.22 ± 0.05	25.96 ± 0.30
	处理	84.33 ± 0.16	37.67 ± 0.20	30.67 ± 0.22	46.18 ± 0.32	18.83 ± 0.12

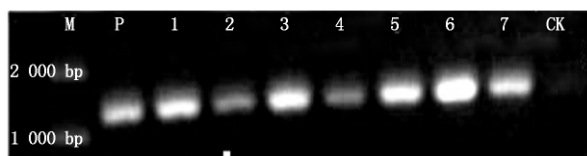
注: a 表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: a indicates the significant difference($P < 0.05$) .

由表 3 可知,经过热激处理后,中华 11 和秀水 11 的绿苗分化率得到显著提高,春江 06 则略有提高;除春江 06 外,其余二者的转化率也都得到显著提高,并且中华 11 的转化提高率达到了 46.2%,由此可见,热

激处理对转化效果已经起到了一定的促进作用,并且中华 11 对该处理反映最为敏感。但是,不同的供试水稻品种,其对热激处理的反映结果表现亦不同。秀水 11 和春江 06 转化率提高主要表现为绿苗分化率

的提高和假阳性率的降低。而中华 11 则只是提高绿苗分化率,并没有降低假阳性率的表现。



M. Marker DL2000; 1~7: 转基因植株; P. *PKCC* 质粒阳性对照; CK. 未转基因植株阴性对照。

M. DNA molecular ladder marker DL2000; P. Plasmid *PKCC* positive control; 1~7. Transgenic plants; CK. Non-transgenic plants negative control.

图 2 部分转基因水稻植株中 *SKC1* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of the *SKC1* gene in part of transgenic rice

表 4 液体共培养处理对耐盐基因 *SKC1* 转化水稻的影响

Tab. 4 Effect of liquid co-culture on rice transformation rate

品种 Varieties		感染数愈伤数 No. of infected callus	绿苗数 No. of green plant	PCR 阳性植株数 No. of PCR positive plant	绿苗分化率/% Differential rate of green plant	假阳性率/% Rate of false positives	转化率/% Rate of transformation
中华 11	对照	95.67 ± 0.32	14.33 ± 0.41	11.67 ± 0.40	14.71 ± 0.09	18.57 ± 0.09	11.98 ± 0.09
	处理	111.33 ± 0.11	26.67 ± 0.17	21.67 ± 0.25	23.85 ± 0.06 a	19.56 ± 0.37	19.25 ± 0.15
秀水 11	对照	99.33 ± 0.22	40.00 ± 0.28	32.00 ± 0.25	39.91 ± 0.07	19.62 ± 0.19	32.06 ± 0.10
	处理	109.33 ± 0.27	49.00 ± 0.27	42.00 ± 0.27	44.88 ± 0.04	14.40 ± 0.20	38.46 ± 0.07
春江 06	对照	105.67 ± 0.08	45.67 ± 0.06	33.67 ± 0.05	43.22 ± 0.05	25.96 ± 0.30	32.03 ± 0.11
	处理	105.00 ± 0.10	52.00 ± 0.02	43.00 ± 0.05	49.76 ± 0.08	17.34 ± 0.13	41.08 ± 0.05 a

3 讨论

从本试验研究结果可以发现,相同的处理方法,不同基因型的水稻表现出不同的表现效果,这一结果与潘素君等^[8]得出的不同亚种对农杆菌的敏感度不同,相同亚种中不同的品种转化率也存在很大差异的结论相同。Yukoh 等^[2]报道,对幼胚诱导的愈伤组织热激处理后进行农杆菌转化,转化效率为 50%~90%,这与本研所得最高转化率秀水 11 的 41.78% 存在一定差距,分析其原因可能是采用的转化受体材料不同。本研究中经 NaCl 筛选后,绿苗分化率为 14.71%~43.22%,与潘素君等^[9]用潮霉素筛选得到的绿苗分化率在 15.4%~47.4% 的结果基本相似。研究中发现,NaCl 筛选下,白苗数普遍增多,这与杜青平等^[10]所得到的结论相同,说明 NaCl 会影响叶绿素的合成。试验是在幼苗水平上进行,但是对愈伤组织也有部分适用,若将愈伤组织在高盐环境下放置较长时间,势必会影响分化期叶绿素的合成,最终导致分化期白苗增多。

本研究结果发现,热激法能显著的提高农杆菌转化效率。本试验采用成熟胚诱导的愈伤组织作为转化材料,其活性相对幼胚诱导的愈伤组织较差,因此,也更不易接受外源基因的导入。通过热激处理,

采用 PCR 法对再生植株进行阳性检测结果见图 2。

2.2 液体共培养对 NaCl 筛选耐盐基因 *SKC1* 转化水稻的影响

采用对 NaCl 筛选法,转化 *SKC1* 基因时,经过液体共培养,中华 11、秀水 11 和春江 06 这 3 个粳稻品种的绿苗分化率和转化率都得到一定的提高(表 4)。中华 11 的绿苗分化率虽然只有 23.85%,但是与对照相比有显著提高;而秀水 11 和春江 06 的绿苗分化率都达到了 40% 以上。中华 11 的转化率 19.25%;秀水 11 为 38.46%;春江 06 的转化率是 41.08%,且转化提高率达到 60.7%。

即在某种程度上对转化细胞造成一定损伤,导致转化细胞分泌酚类化合物,诱导农杆菌 *vir* 基因的活化,促进 T-DNA 摄入与整合,最终表现为转化率的提高。

本研究中,液体共培养法也能提高耐盐基因 *SKC1* 的农杆菌转化效率,试验结果与 Bronwyn 等^[11]的结论基本相同。液体共培养中,农杆菌的浓度比常规农杆菌介导法的低,说明菌液浓度对遗传转化效率也有很大影响^[12]。此外,在液体共培养的培养基中添加半胱氨酸,能够有效消除农杆菌与愈伤组织感染过程中产生的活性氧^[13],减少对愈伤组织细胞的杀伤力,提高转化成功细胞的存活率。将愈伤组织置于滤纸上,滤纸事先浸润在液体共培养基中,扩大了农杆菌与愈伤组织的接触面积,从而使愈伤组织上的农杆菌比固体培养基更易吸收培养基中的营养成分和活性物质,以此提高转化率。

根据以上研究结果,可以设想将热激与液体共培养相结合来进行耐盐基因的转化,研究二者是否能共同促进高效转化,以期建立安全高效的水稻耐盐基因转化技术。

参考文献:

- [1] Zhu Z, Wu R. Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or

- herbicides [J]. Plant Sci 2008 ,174: 423 – 519.
- [2] Yukoh H ,Toshihiko K. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed [J]. Nature Protocols 2008 ,3(5) : 824 – 834.
- [3] Kenjirou. Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant science 2009 ,176: 522 – 527.
- [4] Ren Z H ,Gao J P ,Li L G *et al.* A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter [J]. Nat Genet 2005 ,37: 1141 – 1146.
- [5] 赵 艳 ,罗园园 ,张晓丽 ,等. 一种简便的获得无标记耐盐转基因水稻植株的 NaCl 有效筛选浓度选择法 [J]. 中国水稻科学 2011 ,25(3) : 243 – 248.
- [6] Edwards K ,Johnstone C ,Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucl Acids 1991 ,19: 1349.
- [7] Zhang W ,Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants [J]. Theoretical and Applied Genetics 1988 ,76(6) : 835 – 840.
- [8] 潘素君 ,戴良英 ,刘雄伦 ,等. 农杆菌介导的遗传转化在水稻基因工程中的应用 [J]. 中国稻米 2007(3) : 10 – 14.
- [9] 潘素君 ,戴良英 ,刘雄伦 ,等. 农杆菌介导籼稻转化体系的优化 [J]. 核农学报 2006 ,20(4) : 263 – 268.
- [10] 杜青平 ,孟紫强 ,袁保红. SO_3^{2-} 与 Cl^- 胁迫对小麦幼苗毒性的研究 [J]. 农业环境保护 2002 ,21(4) : 328 – 330 ,342.
- [11] 李维焕 ,张 霞 ,张 慧 ,等. 农杆菌介导的中华补血草遗传转化体系的建立 [J]. 安徽农业科学 2008 ,36(7) : 2668 – 2669.
- [12] Bronwyn R F ,Shou H X ,Rachel K C *et al.* Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system [J]. Plant Physiol 2002 ,129: 13 – 22.
- [13] 魏开发 ,刘逸萍 ,林子英 ,等. 农杆菌介导单子叶植物遗传转化问题与对策 [J]. 植物学通报 2008 ,25(4) : 491 – 496.
- [14] 李洪清 ,李美茹. 影响农杆菌介导植物基因转化的因素问题 [J]. 植物生理学通讯 1997 ,35(2) : 145 – 151.
- [15] 张根义 ,徐 武 ,李 鸣 ,等. 植物细胞感受态研究初探 [J]. 农业生物技术学报 1997 ,1(5) : 100 – 102.
- [16] 胡婷婷 ,刘 超 ,王健康 ,等. 水稻耐盐基因遗传及耐盐育种研究 [J]. 分子植物育种 2009 ,7(1) : 110 – 116.
- [17] Wang Y ,Xue Y ,Li J. Towards molecular breeding and improvement of rice in China [J]. Trends Plant Sci , 2005 ,10(12) : 610 – 614.
- [18] Murakawa T ,Kajiyama S ,Ikeuchi T *et al.* Improvement of transformation efficiency by bioactive-beads-mediated gene transfer using DNA-lipofectin complex as entrapped genetic material [J]. The Society for Biotechnology , 2008 ,1(105) : 77 – 80.
- [19] 王育花 ,继 微 ,肖国樱. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化影响因素研究 [J]. 江西农业学报 2006 ,18(3) : 60 – 63.
- [20] 张素芝 ,荣廷昭. 农杆菌介导的玉米遗传转化系统研究进展 [J]. 遗传 2008 ,30(10) : 1249 – 1256.
- [21] Darbani B ,Eimanifar A ,Stewart C N *et al.* Methods to produce marker-free transgenic plants [J]. Biotechnol J , 2007 ,2: 83 – 90.