

# 宁夏水稻农杆菌转化组培体系的建立

王彩芬<sup>1</sup>, 付永彩<sup>2</sup>, 安永平<sup>1</sup>, 韩国敏<sup>1</sup>, 张文银<sup>1</sup>, 马静<sup>1</sup>

1. 宁夏农林科学院农作物研究所, 宁夏永宁 750105

2. 中国农业大学, 北京 100083

**摘要:** 高效的组培再生体系是水稻农杆菌遗传转化的基础, 以宁夏 4 个主栽水稻品种为受体材料, 对农杆菌转化水稻过程中影响转化效率的几个主要因素进行了研究, 结果表明: 花药和幼胚的愈伤组织诱导率高于成熟胚, 而且愈伤状态好, 有利于转化; 在共培养基上铺上 1 张灭菌滤纸共培养时, 农杆菌在培养基及受体材料表面上不会过度生长, 共培养条件以 26℃, 共培养 2 天的抗性愈伤频率最高; 共培养后不经洗菌处理直接进行筛选的抗性愈伤频率高于洗菌处理; 经过预分化培养可提高分化率; 干燥处理不仅可以有效杀死农杆菌, 而且可以改善愈伤组织状态, 提高转化率。初步建立了宁夏几个主栽品种的农杆菌转化体系。

**关键词:** 农杆菌; 转化体系; 水稻

**中图分类号:** S511.035.3; Q813; Q785

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-204X(2008)03-0009-03

水稻是世界上重要的粮食作物, 并已成为分子生物学研究的模式作物之一。目前, 遗传转化已成为水稻分子生物学和基因工程研究的必须手段。自 1988 年首次获得转基因水稻以来, 水稻转基因技术已获得突飞猛进的发展。目前, 根癌农杆菌介导的转化法已成为水稻基因转化的主要方法之一。近年来, 国内外许多学者对农杆菌转化水稻体系进行了较全面的研究, 建立了适合不同品种的高效转化体系。但是, 利用宁夏水稻品种进行农杆菌转化研究尚属空白, 并且农杆菌的侵染和水稻组织培养都高度依赖于水稻基因型。因此, 本研究选用宁夏近几年选育的 4 个水稻品种为受体材料, 借鉴前人的研究基础建立了这些品种的农杆菌介导的高效遗传转化体系, 并对所获得的转基因植株进行了鉴定分析, 为今后进行水稻转基因研究奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

宁夏近几年育成的水稻品种(粳稻): 宁粳 28 号、宁粳 29 号、宁粳 33 号、宁粳 38 号。

### 1.2 质粒和菌株

pGTV-35S-fer 由中国农业大学植物遗传育种系提供, 该质粒含有大豆铁结合蛋白基因(fer), 可提高转基因水稻种子铁含量, 筛选标记基因为 bar。

农杆菌菌株为 LBA4404, 由中国农业大学植物遗传育种系农业部农作物基因组学与遗传改良重点开放实验室保存。

### 1.3 培养基

农杆菌培养基: YEP+50 mg/L Kan +50 mg/L Rif; 诱导及继代培养基 NB<sub>2</sub>: NB+2mg/L 2,4-D; 共培养基 NBco: NB+2mg/L 2,4-D+100uM/L AS, pH=5.5; 筛选培养基 NBs: NB+2mg/L 2,4-D+20mg/L Basta; 预分化培养基: NB+2mg/L 6-BA+1 mg/L NAA+5mg/L ABA; 分化培养基: NB+3mg/L 6-BA+1 mg/L NAA; 壮苗培养基: 1/2MS +0.5mg/L NAA+0.25mg/L 多效唑。

### 1.4 水稻组织培养和转化受体组织的预处理

将去掉颖壳的水稻成熟种子、授粉后 12~15 天的幼胚和处于减数分裂期的花药等外植体经表面消毒后接种在培养基 NB<sub>2</sub>

上诱导愈伤组织。于 26℃ ± 1℃ 暗培养 15~20 天后, 由成熟胚盾片、幼胚盾片和花药处诱导产生的愈伤组织继代于新鲜的 NB<sub>2</sub> 培养基上, 每 2 周继代 1 次, 经 1~2 次继代后作为受体进行转化。经继代培养后的愈伤组织用于转化时, 在农杆菌侵染前需在新鲜的 NB<sub>2</sub> 培养基上光照培养 4 天。

### 1.5 农杆菌的培养及水稻转化

农杆菌培养: 取甘油保存的农杆菌菌液 5uL 于 10mLYEP 液体培养基 (含 kan50 mg·L<sup>-1</sup>+Rif50 mg·L<sup>-1</sup>), 28℃ 震荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.8~1.0, 4000rpm 离心收集菌体; 将收集到的菌体根据需要量转入 AAM 或 NB 液体培养基稀释, 28℃ 震荡培养至 OD<sub>600</sub>=0.4 左右用于转化, 如共培养后不经过洗菌处理可将 OD<sub>600</sub> 降为 0.1 左右。

侵染: 将培养好的水稻愈伤组织浸入农杆菌菌液, 加入乙酰丁香酮 100uM·L<sup>-1</sup>, 浸泡 20min, 其间晃动几次或在震荡仪中轻微震荡, 取出愈伤组织, 用滤纸吸干菌液, 转移到铺了滤纸的共培养基 NBco 上, 26℃ 暗培养 2~3 天至菌落长出。共培养后愈伤用无菌水清洗 2~3 次, 用 500 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素清洗 1~2 次。取出愈组用滤纸吸干水分, 经过干燥处理后转入筛选培养基 NBs (20 mg·L<sup>-1</sup> 除草剂 +500 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素) 上筛选, 或不洗菌直接转入筛选培养基。

### 1.6 转化子的筛选和植株再生

共培养后的愈伤转入筛选培养基, 筛选 2 次, 每次 2~3 周。将抗性愈伤转移到预分化培养基或分化培养基上, 26℃ 光照培养 3~4 周, 将分化出的小苗转入生根壮苗培养基, 26℃ 光照培养, 待根系生长良好, 小苗长至 8~10cm 时, 移栽于温室。

### 1.7 转化植株的分子生物学鉴定

采用 CTAB 法提取水稻叶片的总 DNA, 根据大豆铁结合蛋白基因设计引物进行 PCR 扩增, 引物序列为 P1: ATGGCTCTGCTC-

收稿日期: 2008-04-23

\* 基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目资助 (编号: NZ0634)。

作者简介: 王彩芬(1968-), 女, 硕士学位, 副研究员, 在宁夏农林科学院农作物研究所从事水稻生物技术育种工作, 发表论文 20 篇。

CATCAAAGTT 和 P2: TTGATCAAAGTGCCAAACACCGTG。PCR 反应体系: 20 $\mu$ L, 2 $\mu$ L PCR Buffer, 0.5 $\mu$ L 4 $\times$ dNTP, 1 $\mu$ L P1, 1 $\mu$ L P2, 2 $\mu$ L 模板 DNA, 0.25 $\mu$ L Tag DNA Polymerase, 以及 13.25 $\mu$ L 去离子水。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 然后接 94 $^{\circ}$ C 30S, 57 $^{\circ}$ C 40S, 72 $^{\circ}$ C 1.5min 扩增 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延长 10min; 10 $^{\circ}$ C 结束。扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 受体材料的选择与诱导

#### 2.1.1 不同受体组织的愈伤组织诱导率

在植物遗传转化中, 外植体的选择至关重要, 近几年, 在水稻遗传转化中应用较多的是胚性愈伤组织、幼胚、成熟胚等。

将水稻成熟胚、幼胚和花药接种到 NB 诱导培养基上, 结果发现幼胚出现愈伤组织的时间早于成熟胚, 生长速度快于成熟胚, 愈伤状态好于成熟胚, 花药出现愈伤组织的时间迟, 但状态好。水稻幼胚和花药的取材受季节和环境的限制, 取材时间严格, 过早或过晚都会导致愈伤诱导的失败, 另外, 花药愈伤在植株再生时不可避免地会出现白化苗, 而成熟胚的取材不受上述条件的限制, 因此, 成熟胚作为转化的受体材料仍然被广泛的应用。

从表 1 看出, 花药和幼胚的愈伤组织诱导率高于成熟胚, 而且不同材料之间差异较大, 宁粳 28 号最低, 宁粳 33 号最高。花药和幼胚取材受季节限制, 而成熟胚(种子)取材方便, 因此, 转化时应根据具体情况来确定受体材料。

#### 2.1.2 附加物对愈伤组织诱导率的影响

高质量的愈伤组织是转化成功的关键。试验采取调整碳源浓度和附加成分来改善愈伤组织状态。配方如下: I: NB 基本培养基 + 水解酪蛋白 300 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 谷氨酰胺 500mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 脯氨酸 600 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Suc30g $\cdot$ L $^{-1}$ ; II: NB 基本培养基 + 水解酪蛋白 300 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 谷氨酰胺 500 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 脯氨酸 1000 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Suc45g $\cdot$ L $^{-1}$ ; III: NB 基本培养基 + 水解酪蛋白 300 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 谷氨酰胺 500 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + 脯氨酸 600 mg $\cdot$ L $^{-1}$  + Suc60g $\cdot$ L $^{-1}$ 。

从表 2 看出, 配方 II 的愈伤组织诱导率和愈伤组织状态最好, 表明在诱导培养基中适当增加蔗糖和脯氨酸浓度可提高愈伤组织诱导率, 改善愈伤质量, 抑制根毛生长消耗营养。

同时, 在筛选后将抗性愈伤组织先转入含有 5mg/L ABA 的预分化培养基培养 10~15 天, 然后再进行再生培养, 可改善愈伤状态, 提高分化率。

### 2.2 转化条件的优化

#### 2.2.1 共培养时间和温度对抗性愈伤组织频率的影响

共培养是农杆菌转化过程中的主要环节之一。在借鉴前人研究成果的基础上进行了共培养时间和温度的转化试验, 结果见表 3。从表 3 看出, 共培养时间和温度对抗性愈伤组织频率影响较大, 以 26 $^{\circ}$ C, 共培养 2 天的抗性愈伤组织频率最高。在试验过程中发现, 共培养时间太长农杆菌难以抑制, 影响转化效率。

#### 2.2.2 洗菌对抗性愈伤组织频率的影响

据文献报道, 农杆菌转化时, 在共培养后通常用含有抗生素的水进行清洗, 再转入筛选培养基。本试验设计了不经过洗菌直接转入含有抗生素的筛选培养基的处理, 从表 4 可以看出, 共培养后不清洗的抗性愈伤频率为 47.1%, 而经过清洗后的筛选频率为 32.0%。这是因为农杆菌侵染时只留在愈伤组织表面, 清洗后将农杆菌洗掉了, 减少了农杆菌侵染的数量, 从而减少了抗性愈伤的数量。但必须注意农杆菌菌液浓度不能太大, 共培养时间不能

超过 3 天, 否则, 愈伤受到伤害大, 而且农杆菌也不容易抑制。

#### 2.2.3 干燥处理对抗性愈伤组织频率的影响

许多研究者对不同的干燥培养方式进行了研究, 认为干燥培养方式对抗性愈伤组织频率和分化率有明显影响。本研究对 2 种干燥处理方式进行了研究, 洗菌后将愈伤转移到无菌滤纸上干燥培养 2~3 天或在超净工作台上吹干 2~3h, 以去除组织中多余的水分。结果表明, 与未干燥处理对照相比, 2 种干燥处理方式抗性愈伤频率均有所提高, 说明干燥处理不仅可以有效杀死农杆菌, 而且可以改善愈伤组织状态, 提高转化率。不同品种对 2 种处理的反应不同, 以在超净工作台吹干 2~3h 的方式效果最好。

### 2.3 转化植株的获得

用含有 pGTV-35S-fer 质粒的农杆菌菌株 LBA4404 转化宁粳 28 号、宁粳 29 号、宁粳 33 号、宁粳 38 号成熟胚愈伤组织, 并以除草剂 Basta 进行 2 轮抗性愈伤筛选, 通过对抗性愈伤组织的分化、再生等过程共获得 39 株独立的转基因植株。

### 2.4 转化植株的 PCR 检测

对 T<sub>0</sub> 代转 Fer 水稻植株进行 PCR 检测, 以确定除草剂选择抗性愈伤组织的可信度。以 Fer 基因设计特异性引物, 以水稻叶片基因组 DNA 为模板对 39 株转基因苗进行了 PCR 扩增, 部分结果如图 1。共有 26 株能扩增出与目标片段 (750bp) 大小相近的条带, 见表 5, 而未转基因植株和对照水则没有相应的条带(图 1)。初步证明 Fer 基因已转入水稻细胞中, 最高转化率 6.74%。

表 1 不同受体组织的愈伤组织诱导率

品种名称	愈伤组织诱导率(%)		
	花药	幼胚	成熟胚
宁粳 28 号	48.6	52.3	36.7
宁粳 29 号	71.5	65.4	58.4
宁粳 33 号	80.3	74.7	68.0
宁粳 38 号	72.2	69.6	61.9

表 2 不同培养基配方愈伤组织诱导率

培养基配方	接种胚数	诱导愈伤数	愈伤诱导率(%)	愈伤状态
I	120	81	67.5	松散
II	120	103	85.8	致密, 新鲜
III	120	75	62.5	老化

表 3 共培养时间和温度对抗性愈伤组织频率的影响

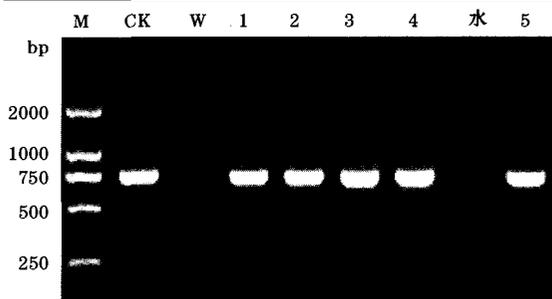
处理方法	参加筛选愈伤数	抗性愈伤数	抗性愈伤频率(%)
28 $^{\circ}$ C, 2 天	60	14	23.3
26 $^{\circ}$ C, 3 天	75	16	21.3
26 $^{\circ}$ C, 2 天	75	23	30.7
22 $^{\circ}$ C, 4 天	50	8	16.0

表 4 洗菌对抗性愈伤组织频率的影响

处理方法	参加筛选愈伤数	抗性愈伤数	抗性愈伤频率(%)
共培养后洗菌	75	24	32.0
共培养后不洗菌	87	41	47.1

表5 不同材料的转化率

方法	试验材料	参试愈伤数	再生植株数	PCR阳性株数	转化率(%)
农杆菌转化	宁粳28号	166	12	8	4.82
农杆菌转化	宁粳29号	89	10	6	6.74
农杆菌转化	宁粳33号	128	9	7	5.47
农杆菌转化	宁粳38号	85	8	5	5.88



注: M: DNA 分子量标记; CK: 载体质粒对照; W: 未转化植株; 1~5: 转化植株; 水: 对照

图1 部分转化植株总 DNA 的 PCR 扩增电泳图

## 2.5 根癌农杆菌介导的水稻转化体系的建立

根据两年的试验研究结果,初步建立了宁夏4个主栽水稻品种的农杆菌转化组培体系。转化程序为:愈伤组织诱导→农杆菌培养(摇菌、离心收集菌体、稀释 $OD_{600}=0.1\sim 0.2$ )→农杆菌侵染愈伤组织(28℃,100rpm,30min)→滤纸吸干水分,在超净台吹2~3h→共培养(26℃,2d)→不洗菌直接转入筛选培养基→抗性愈伤组织转入分化培养基→再生植株转入壮苗培养基(1/2MS)→移栽→鉴定。最高转化效率为6.75%。

## 3 讨论

农杆菌介导的外源基因转化是农杆菌菌株与植物细胞之间相互作用的结果。影响农杆菌转化水稻效率的因素有很多,包括

水稻基因型、外植体种类、农杆菌菌株和质粒载体、培养基组分、共培养时间、浸染方式等,凡是影响农杆菌 Vir 基因活化和愈伤组织生长和再生的因素都可能影响到水稻的成功转化。本研究在前人研究的基础上,从受体组织的选择、培养基添加附加物、愈伤组织状态、共培养条件、洗菌及干燥处理等方面进行了研究,取得了较好的结果。试验结果表明,不同受体组织的愈伤组织诱导率和愈伤状态差异较大,花药和幼胚的愈伤组织诱导率高于成熟胚,而且愈伤状态好,有利于转化;经过预分化培养可提高分化率;在共培养基上铺上1张灭菌滤纸,共培养时农杆菌在培养基及受体材料表面上不会过度生长,共培养条件以26℃,共培养2天的抗性愈伤频率最高;共培养后不经洗菌处理直接进行筛选的抗性愈伤频率高于洗菌处理;干燥处理不仅可以有效杀死农杆菌,而且可以改善愈伤组织状态,提高转化率,以在超净工作台吹干2~3h的方式效果最好。这些结果与前人的研究结果一致<sup>[1-4]</sup>。

转化效率是评价转化系统是否成功的重要依据。本研究初步建立了宁夏几个主栽品种的农杆菌转化体系,转化体系还不太完善,转化效率有待于进一步提高。同时对转基因后代仅做了PCR初步分析,没有进行Southern杂交进一步验证,对转基因后代的遗传分析也正在进行中。因此,本研究还需进一步深入,研究结果后续发表。

### 参考文献:

- [1] 曹孟良.农杆菌介导的水稻高效遗传转化体系的建立.湖南农业大学学报,1999,25(5):349~356
- [2] 易自力,曹守云,王力,等.提高农杆菌转化水稻频率的研究.遗传学报,2001,28(4):352~358
- [3] 李双成,王世全,尹福强,等.提高农杆菌介导转化水稻效率的因素.中国水稻科学,2005,19(3):231~237
- [4] 周玲艳,姜大刚,吴豪,等.农杆菌介导水稻转化条件的优化.华南农业大学学报(自然科学版),2003,24(3):43~45

责任编辑:李晓瑞

(上接第37页)

“0105”枸杞栽培性状表现优良,生长、结果良好,说明“0105”枸杞抗盐碱能力强,适应性强。

试验发现,“0105”枸杞较对照存在的主要问题仍然是抗病虫害能力不强,容易感病,主要是螨严重;同时,“0105”枸杞长势强旺,需肥水量也较大,因此,“0105”枸杞需要加强田间管理,重点关注以下几个问题:

一是病虫害防治。因“0105”枸杞容易感病,相对增加了防治难度和次数,必须加强病虫害预防工作,特别是在发芽前及时喷施农药1~2次,如用石硫合剂+毒死蜱等喷施全园,能够有效控制螨等病虫害的发生。

二是肥水管理。因“0105”枸杞生长旺,需肥水量较大,应增加施肥量,特别是在秋冬季要多施一些基肥,以农家肥为主,每株施30kg以上,在展叶后生长初期及时追肥,适当增加化肥的施用量,每株施0.4kg以上。我区气候干旱,夏季炎热、蒸发量大,在6月中旬至7月下旬,根据天气状况要增加灌水1~2次。

三是修剪。因“0105”枸杞萌芽多,且发枝量大,要及时做好剪枝和抹芽工作,尽量减少不必要的营养损失。主要是按常规加

强冬季修剪,剪除徒长枝和稠密的枝条,采取中、重度短截,培养结果枝组和延长枝,在夏季及时抹芽,约7天抹芽1次。

四是晾晒制干。因“0105”枸杞果个很大,肉厚,含水量较大,为加快制干速度,增强干果红色度,用鲜果量2%的碳酸钾脱脂后晾晒制干,效果较好。

## 3 小结与总体评价

本试区4年区试结果表明,“0105”枸杞较对照的优势:一是树体发枝量大,生长快,长势旺;二是枸杞果个大,千粒重高,产量高;三是抗盐碱,适应性强;四是鲜果粘性强,口感很甜。

从总体情况看,“0105”枸杞在原州区进行的区域试验取得了明显成效,且有一定影响力,受到各级领导的关注和技术人员的认可,也得到当地群众的喜爱和好评,认为该品系增产增收明显,能够较大的提高经济效益,在本区有一定的推广价值和发展潜力。

责任编辑:褚庆芳