

文章编号:1003-8701(2005)02-0003-04

抗除草剂基因基因枪法转化粳稻的研究

王景余¹,金成海²,方秀琴²,林秀峰³,林秀云²

(1.北京师范大学生命科学院植物发育生理研究室,北京 100875;

2.吉林省农业科学院水稻研究所,吉林 公主岭 136100;3.吉林省农业科学院生物技术中心)

摘 要:优化了粳稻的组织培养体系;通过 Gus 基因的瞬时表达研究,明确了以 DNA 金弹到靶细胞距离为 9 cm,轰击 2 次时,PDS1000/He 基因枪法转化水稻胚性愈伤组织的效率最高。应用基因枪法将抗除草剂基因(bar)转入吉林省主栽的水稻品种长白 8 号中,获得了可育的转基因水稻植株。经过 Gus 基因的组织化学分析,PCR 和 Southern 杂交检测,证明抗除草剂基因已整合到水稻基因组中得以表达,使水稻产生对除草剂的抗性。转基因水稻中发现一例基因沉默现象。

关键词:水稻;转基因;抗除草剂;基因枪

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:A

随着生物技术研究的深入和发展,水稻转基因技术已成为除常规育种技术之外的重要辅助育种手段之一,并取得了可喜的成绩。1988 年以后,水稻转基因研究得到了突飞猛进的发展。不仅获得了大量稳定遗传的转基因植株,提高了转化效率,同时也推动了其他单子叶植物基因转化体系的研究,使水稻成为单子叶植物基因表达调控研究的模式植物。科学家们已将转基因技术同水稻常规育种手段结合起来,将有益农艺性状基因导入水稻基因组中,如抗虫基因^[1,2]、抗病基因^[3,4]、抗除草剂基因^[5]、提高光合效率^[6]及品质改良基因^[7,8]等,并培育出一些转基因新品系,有的已进入大田释放阶段^[9]。

本文应用基因枪法将抗除草剂基因(bar)导入吉林省主栽水稻品种长白 8 号中,获得了除草剂抗性转基因水稻植株。

1 材料与方法

1.1 质粒、植物材料及培养基

pDM803,含抗除草剂基因(bar),以 ubi 为启动子,报告基因 Gus,以 rbcS 为启动子。质粒框图结构如下:rbcS-Gus-ubi-bar-nos

吉林省地方粳稻(Japonica)品种长白 8 号、丰优 307 和超产 2 号。

基本培养基:NMB(N₆大量元素,MS 微量元素及铁盐,B₅有机成分)、脯氨酸 500 mg/L、谷氨酰氨 250 mg/L、水解酪蛋白 300 mg/L、蔗糖 30 g/L 和琼脂粉 8 g/L,pH 5.8。

愈伤组织诱导基本培养基:基本培养基附加 2,4-D 2 mg/L;愈伤组织继代培养基附加 KT 0.5 mg/L、NAA 1 mg/L 和 2,4-D 2 mg/L;愈伤组织分化培养基 KT 2 mg/L、NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L。

1.2 吉林省主栽水稻品种再生培养体系的优化

将去掉颖壳消毒过的水稻种子接种在诱导培养基上,7~10 d 后去掉芽鞘继续诱导。25~30 d 从盾片上长出愈伤组织,从中挑选浅黄、颗粒状、质地紧密的愈伤组织继代培养。配制 NMB-1 和 NMB-2 两种继代培养基。NMB-1 激素成分为 2,4-D 2 mg/L,NMB-2 激素成分为 2,4-D 1 mg/L、NAA 1 mg/L、

收稿日期:2004-11-03

作者简介:王景余(1964-),男,黑龙江省五常人,研究员,博士后,主要从事水稻转基因和水稻遗传改良研究。

KT 0.5 mg/L。愈伤组织分化前进行 16 h 干燥处理。

1.3 基因枪法转化参数的优化

采用 PDS1000/He(Bio-Rad)型基因枪 ,应用 Gus 基因的瞬时表达 ,以 DNA 金弹到靶细胞为 6、9 和 12 cm 及轰击 1、2 和 3 次的不同组合处理优化基因枪法转化胚性愈伤组织的各种参数。转化方法参照文献[8]。

1.4 Gus 基因的组织化学分析

轰击后的愈伤组织用 Gus 染色液浸泡过夜 ,显微镜下观察。转基因植株的叶片经 Gus 染色液浸泡过夜后 ,用固定液(乙醇:乙酸=3:1)固定 ,70%乙醇脱色。Gus 染色液的组成 :0.1 mol 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)、5 mmol 铁氰化钾、5 mmol 亚铁氰化钾、1.0 mmol EDTA、0.1% Triton-100 和 0.1% 的 5-溴-4-氯-3-吲哚-葡萄糖苷酸(X-Gluc)。

1.5 转基因水稻植株的 Basta 除草剂抗性鉴定

转基因植株叶片用含 PPT 200 mg/L 的 Basta 除草剂涂布 ,3 d 后观察叶片生长情况。

1.6 转基因植株的 PCR、Southern 杂交分析

以 bar 基因序列设计引物。引物 1 :5' GCAGGAACCGCAGGAGTGA3' ,引物 2 :5' ATCTCGGT-GACGGGCAGGAC3'。25 μL 反应体系。扩增条件 :预变性 94℃ 3 min。变性温度为 94℃ 1 min ;退火温度 61℃ 1 min ;延伸温度为 72℃ 60 s ,循环 35 次 ,最后在 72℃下补齐 10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳。Southern 杂交应用 ECL 试剂盒 ,应用 pDM803 质粒中 bar 基因序列的 PCR 扩增产物为探针。

2 结果与讨论

2.1 吉林省主栽水稻品种再生培养体系的优化

2.1.1 继代培养基不同激素对水稻愈伤组织分化的影响

由吉 89-45 和超产 2 号诱导出的愈伤组织经 过含不同的激素培养基继代培养 3 次 (每 2 周继代一次)后 ,移至同一种分化培养基上 ,经 4 周的分化培养后 ,按能够分化成水稻植株的愈伤组织块数占接种愈伤组织块数的比率 ,分别统计愈伤组织的分化频率(表 1)。

从表 1 看出 ,89-45 和超产 2 号的愈伤组织在激素仅为 2,4-D 的培养基上长期继代 ,分化频率只有 66.7%和 48.2%。愈伤组织生长较快、松软 ,降低了分化能力 ;而降低 2,4-D 浓度 ,配合使用 NAA 及少量 KT ,可以改进愈伤组织的质量 ,提高分化能力 ,两者的分化频率分别达到 88.2%和 82.1% ,将愈伤组织的分化频率提高了 20%~34%。

2.1.2 干燥处理对水稻愈伤组织分化能力的影响

由吉 89-45、超产 2 号和丰优 307 三个基因型诱导出的愈伤组织在分化培养前进行 16 h 的脱水干燥处理 ,然后转至分化培养基上进行分化培养 ,先暗培养 1 周 ,然后光照培养 ,4 周后统计分化频率。结果表明 ,干燥处理对水稻愈伤组织分化频率具有较大的影响 ,能显著提高水稻愈伤组织的分化频率(图 1)。

干燥处理可以促进体细胞胚的发育。Zhang(1996)等报道了用简单的脱水处理法促进粳稻愈伤组织的再生 ,他们认为 ,干燥处理在一定时间内造成了水分含量降低 ,引起细胞生理生化上的变化 ,这些变化可能正是植株再生所需要的。上述结论在本试验中也得到了证实。3 个品种经干燥处理的愈伤组织的分化率分别达到 82.9%、85.7%和 45.7% ,而未经干燥处理的只有 51.4%、48.5%和 25.1% ,3 个

表 1 继代培养基对愈伤组织分化能力的影响

品 种	培养基	接种愈伤组织块数	分化愈伤组织块数	愈伤组织分化频率(%)
89-45	NMB-1	72	48	66.7
89-45	NMB-2	68	60	88.2
超产 2 号	NMB-1	58	28	48.2
超产 2 号	NMB-2	84	69	82.1

注 NMB-1 为 NMB 培养基 ,附加激素 2 mg/L 的 2,4-D ,NMB-2 为 NMB 培养基 ,附加激素 2,4-D、NAA、KT 分别为 1、1 和 0.5 mg/L。

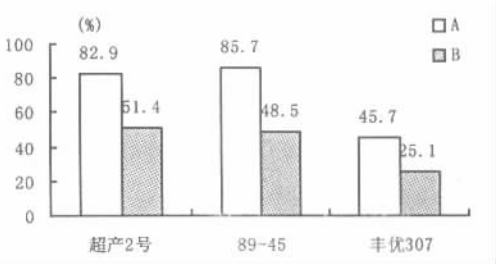


图 1 干燥处理对水稻愈伤组织分化频率的影响

基因型再生频率分别提高了 31.5、37.2 和 20.6 个百分点 (图 1)。实验中发现干燥处理时间达到 36 h 后 ,愈伤组织会因为脱水过多而枯萎 ,失去正常的分化能力 ,降低了分化频率(只有 3%)。

2.2 基因枪转化参数的优化

基因枪的轰击参数 ,如粒子速度、入射密度、阻挡板至样品室高度和轰击次数等均影响转化效率。选用 1100psi 的可裂膜和水稻长白 8 号的胚性愈伤组织 ,应用 Gus 基因的瞬时表达进行基因枪法转化水稻的优化试验。轰击 3 d 后观察愈伤组织上的蓝点数。

结果表明 ,在 DNA 金弹到受体的距离为 6 cm、轰击次数为 1、2 和 3 次时 ,Gus 基因瞬间表达频率分别为 86.5%、90.9%和 90.0%。3 种处理 ,随着轰击次数增多 ,Gus 基因的瞬时表达效率而提高 ,但结果相差不大 ;在 9 cm 处时 ,轰击 1 次、2 次和 3 次的转化效率分别为 30.6%、88.2%和 95.8%。以轰击 3 次效率最高 ;在 12 cm 处时 ,转化效率明显降低。在距离相同时 ,随着轰击次数增多 ,转化效率提高。实验中 ,阴性对照均未出现蓝点。同时观察到在 6 cm 处近距离轰击 ,DNA 金弹对转化的受体细胞造成了破坏 ,并且强大的气流常使愈伤组织块四处飞散。同时枪击次数的增多 ,加大了转化的成本 ,而转化效率并未显著提高。综合各影响因素 ,确定在 9 cm 处 ,轰击次数 2 次为最佳转化条件(图 2)。

2.3 转基因水稻植株的获得

转化后的愈伤组织在不含选择剂的培养基上恢复生长 1 周 ,然后转入含 PPT 10 mg/L 的筛选培养基 ,每 15 d 继代 1 次。继代 2~3 次后非转化细胞褐化死亡 ,最后抗性愈伤组织经 Gus 染色 ,整块变成蓝色。将剩下的抗性愈伤组织转入含 1 mg/L PPT 的分化培养基 ,在 28℃光照条件下分化培养。4 周后得到转基因水稻植株 ,在 1/2MS 培养基上进行生根培养 ,待转基因植株生长健壮后 ,经炼苗移栽温室。共得到 5 个转基因水稻植株 ,获得的当代转基因水稻植株结实率很低。

2.4 转基因水稻植株 Gus 基因的组织化学分析

5 个转基因植株经 Gus 基因的组织化学分析 ,有 3 株转化植株的叶片变为蓝色 ,为 Gus 染色阳性 ,分别为 D₀-1 ,D₀-2 ,D₀-3。而对照植株叶片和另两个转基因植株 D₀-4 和 D₀-5 为白色。

2.5 转基因水稻植株 Basta 除草剂抗性鉴定结果

经除草剂叶片涂布试验 ,D₀-1 ,D₀-2 ,D₀-3 3 个转基因水稻植株叶片仍为绿色 ,表现对 Basta 除草剂有抗性。说明在阳性转基因植株中抗除草剂基因整合到水稻基因组中得以表达 ,使转基因水稻植株产生除草剂抗性。而未经转化的对照植株和 Gus 检测为阴性的两个转基因植株(D₀-4 和 D₀-5)叶片枯黄 ,表现对 Basta 除草剂敏感。

2.6 转基因水稻植株 PCR 检测结果

以未转化植株 DNA 为对照进行 bar 基因扩增。PCR 检测结果表明 ,D₀-1 ,D₀-2 ,D₀-3 和 D₀-5 转基因植株中检测到与质粒相同的 bar 基因目标带 ,证明转化植株基因组 DNA 中含有 bar 基因片段。而阴性对照与 D₀-4 中没有出现目标片段 ,说明 D₀-4 为假阳性转基因植株(图 3)。

2.7 转基因水稻植株 Southern 杂交检测结果

提取转基因水稻植株和对照水稻品种长白 8 号基因组 DNA ,以质粒 pDM803 为对照 ,进行琼脂糖凝胶电泳 ,以 bar 基因的 PCR 扩增产物为探针进行 Southern 杂交检测。结果表明 ,D₀-1 ,D₀-2 ,

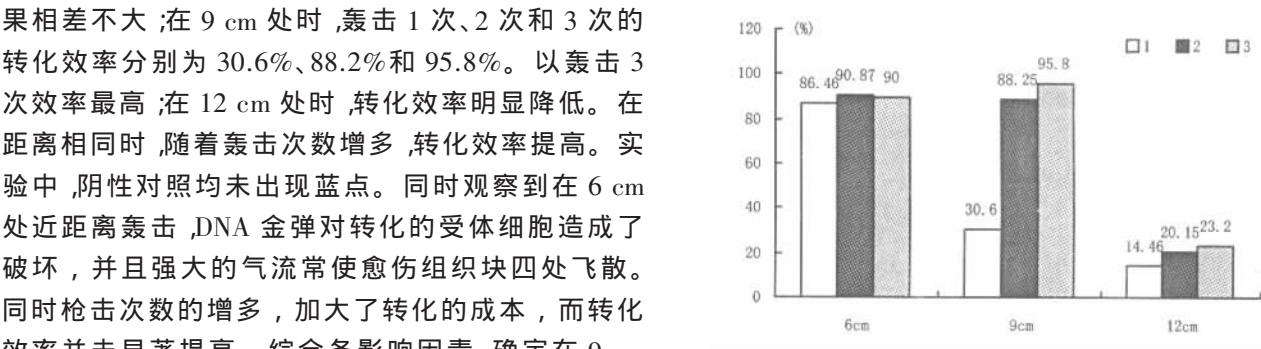


图 2 不同基因枪转化参数对 Gus 基因瞬间表达的影响

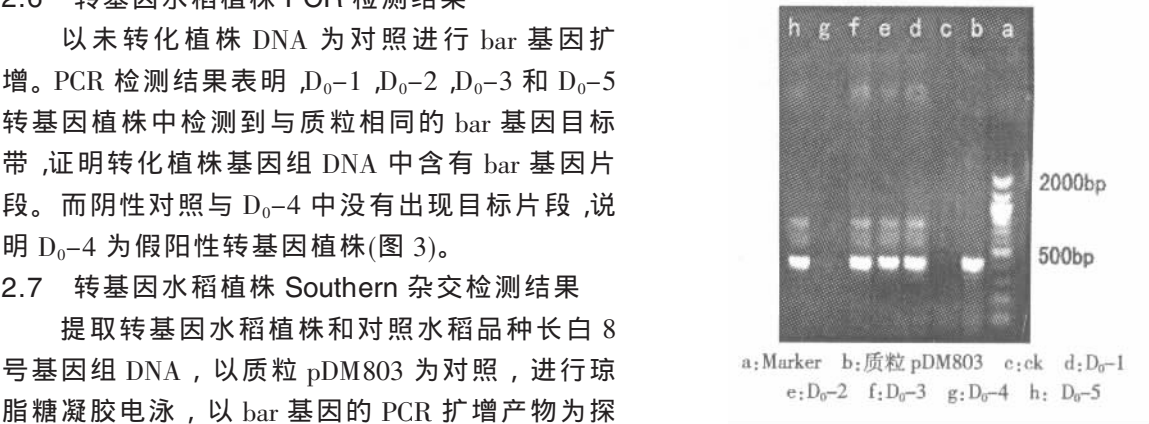


图 3 转 bar 基因水稻植株 PCR 检测

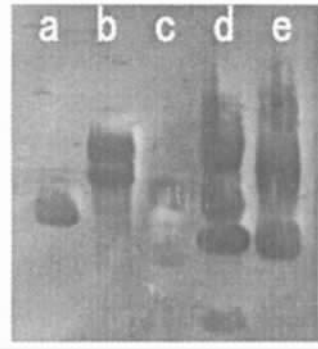
D₀-3 和 D₀-5 植株出现与探针 DNA 的杂交带,呈阳性。而对照为阴性,无杂交带出现。经 PCR 与 Southern 杂交检测,转基因植株 D₀-5 虽为阳性,但其植株叶片对除草剂敏感,Gus 的组织化学分析也呈阴性反应。说明转基因植株 D₀-5,虽然外源基因片段已插入水稻基因组中,但并没有表达,可能产生基因沉默现象。杂交结果见图 4。

目前多个实验室将 Bar 基因用做选择标记基因。研究中发现,在转基因愈伤组织的分化阶段,如果 PPT 浓度过高时,对转基因植株的生根过程产生不利影响。由于除草剂的长期胁迫,植株

的叶片卷曲,根的基部产生块状突出,出现明显的水稻除草剂中毒症状。本研究中发现一例产生基因沉默现象的转基因水稻植株。转基因植物中外源基因的沉默现象对转基因植物的应用是一个不利因素,今后如何避免外源基因的沉默现象是植株基因工程值得深入研究的课题。

参考文献:

- [1] Fujimoto H, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 1993, (11): 1151-1155.
- [2] Irie K, et al. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Molecular Biology*, 1996, (30): 149-157.
- [3] Hayakawa T, et al. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, (89): 9865-9869.
- [4] Tu J. Transgenic rice variety "IR72" with Xa21 is resistant to bacterial. *Theor Appl Genet* 1998, (97): 31-36.
- [5] 黄大年,等.用抗除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度的新技术[J].*科学通报*,1998,43(1):67-70.
- [6] Matsuoka M, et al. The promoters of two carboxylases in a C4 plant (maize) direct cell-specific, light-regulated expression in a C3 plant (rice). *The Plant Journal*, 1994, 6(3): 311-319.
- [7] Shimada H, et al. Antisense regulation of the rice waxy gene expression using aPCR-amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch. *Theor. Appl. Genet.* 1993, 86: 665-672.
- [8] Yokoi S, et al. Introduction of the cDNA for Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Molecular Breeding*, 1998, (4): 269-275.
- [9] 舒庆尧,等.转基因水稻"克螟稻"选育[J].*浙江农业大学学报*,1998,24(6):579-580.



a 质粒 b D₀-1 c D₀-2 d D₀-3 e D₀-5

图4 转 bar 基因水稻 Southern 杂交检测

Transformation of Herbicide Resistant Gene to Rice via Biolistic Method

WANG Jing-yu, et al.

(College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 10087,5 China)

Abstract: A herbicide gene(bar) was delivered into a commercial rice variety "Changbai 8" cultivated in Jilin province via biolistic method. Five fertile transgenic rice plants were obtained. Parameters of Gene Gun(PDS-1000/He) transformation of callus derived from mature embryo of Japonica rice variety were optimized by Gus gene transient expression. When the distance between DNA-gold pellet and the target cells was 9 cm, bombard for 2 times, the transformation efficiency was the highest. It was demonstrated that bar gene had been inserted into rice genome by PCR and Southern hybridization. Three transgenic rice plants (D0-1, D0-2 and D0-3) showed herbicide resistance. Gene silence was observed in one transgenic rice plant (D0-5).

Key words: Rice; Gene transformation; Herbicide resistant; Biolistic