

文章编号:1003-8701(2005)02-0007-03

# 转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得

林秀峰,刘志铭

(吉林省农业科学院生物技术研究中心,吉林 公主岭 136100)

**摘要:**利用农杆菌介导法,将来源于山菠菜的甜菜碱醛脱氢酶基因(BADH)转到水稻品种丰优 516 成熟胚诱导的愈伤组织,所获得的 G418 抗性植株,分别在含有 5 g/L 和 8 g/L NaCl 的生根培养基上进行耐盐性筛选,然后对抗性植株进行 PCR 分子检测,最终获得 73 株耐盐的转 BADH 基因植株。

**关键词:**水稻;甜菜碱醛脱氢酶基因;转化;耐盐性

中图分类号:S511.035.3

文献标识码:A

大量研究发现,许多高等植物在盐碱或缺水的情况下,会在细胞内积累甜菜碱、甘氨酸类物质,使许多代谢中的重要酶类在渗透胁迫下保持其活性。甜菜碱对呼吸酶和其他酶有很好的保护效应<sup>[1]</sup>,而甜菜碱醛脱氢酶(BADH)是合成甜菜碱的关键酶<sup>[2]</sup>。本研究旨在用农杆菌介导法将 BADH 基因的植物二元表达载体转入吉林主推水稻品种丰优 516 中,获得耐盐的转基因水稻。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻品种和转化受体材料

水稻丰优 516。转化受体材料为水稻成熟胚诱导产生的愈伤组织。

### 1.2 菌株及质粒

所用的根癌农杆菌菌株为 LBA4404,质粒 PBI<sub>n</sub>438 BADH 图谱见图 1。

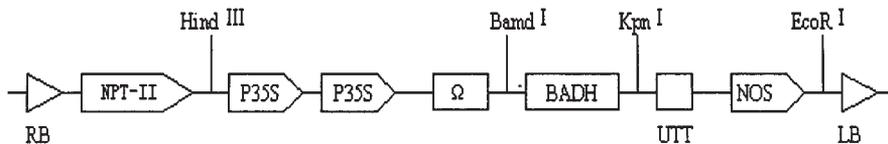


图 1 含甜菜碱醛脱氢酶基因(BADH)的双元载体构建图

### 1.3 培养基

诱导与继代培养基:NB + 2 mg/L 2,4-D; 共培养培养基:NB + 2 mg/L 2,4-D + 19.62mg/L 乙酰丁香酮;筛选培养基:NB + 2 mg/L 2,4-D + 150 mg/L G418 + 400 mg/L 头孢霉素;预分化培养基:NB + 2 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA + 5 mg/L ABA + 100 mg/L G418 + 400 mg/L 头孢霉素;分化培养基:NB + 2 mg/L KT + 1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 100 mg/L G418 + 300 mg/L 头孢霉素;壮苗培养基:1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 100 mg/L G418 + 250 mg/L 头孢霉素。

### 1.4 愈伤组织选择压的确定

选择生长良好的愈伤组织称其鲜重(约 0.2 g),分别接种在含 G418(浓度分别为 0、25、50、75、100、150 和 200 mg/L)的诱导培养基上,培养两周后再称其鲜重,计算其在不同浓度下的愈伤增重率(每一浓度 3 个重复,取平均值)。

收稿日期:2004-11-11

基金项目:国家转基因植物研究与产业化开发专项(J99-B-001)资助

作者简介:林秀峰(1964-),女,吉林省农科院副研究员,主要从事水稻遗传转化及分子育种研究。

## 1.5 外源 DNA 的转化及转基因植株的获得

取保存的农杆菌,接种于含 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 培养基中,在 28℃ 和 250 r/min 条件下振荡培养至生长对数期(OD600 约 0.5~1.0)。将培养好的农杆菌菌液在 4 000 r/min 条件下离心 5 min,然后重新悬浮于等体积的 AAM<sup>[3]</sup>培养基中备用。

选取生长良好的胚性愈伤组织,置于上述的 AAM 培养基中浸染,250 r/min 条件下振荡 20~30 min,再用无菌滤纸吸去多余的菌液。置于共培养培养基(可覆盖一层无菌滤纸)上,25℃ 暗培养 3 d。共培养后的愈伤组织先用无菌水冲洗 3 次,再浸于含 250 mg/L 头孢霉素的无菌水洗 3 次,然后将愈伤组织用无菌滤纸吸干,接种于筛选培养基上,进行抗性筛选。

将经过 2 次选择得到的抗性愈伤组织接种到预分化培养基上弱光培养 10 d 左右,再转到分化培养基上进行光照培养约 1~2 个月,分化成苗。将 2 cm 左右的幼苗转到生根培养基(含 5 g/L 或 8 g/L NaCl)上进行生根培养和初步耐盐筛选。当苗高 8~10 cm 左右时打开瓶口炼苗,7 d 左右移栽。

## 1.6 转基因植株的 PCR 检测

DNA 的提取与纯化参照王关林等方法<sup>[4]</sup>。根据 BADH 基因两端序列,设计合成两个 PCR 扩增引物为 P1:AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTC;P2:TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCCA。PCR 扩增参数按照肖岗等方法<sup>[5]</sup>。

# 2 结果与分析

## 2.1 G418 筛选浓度的确定

不少研究者认为,水稻对卡那霉素具有本底抗性,NPT II 是双子叶植物遗传转化的有效选择标记基因,而对禾谷类等单子叶植物无效<sup>[6]</sup>。本实验以 G418 替代卡那霉素,研究表明,100 mg/L G418 基本抑制未转化细胞的生长(表 1),考虑降低转化过程的假阳性率,本实验将继代筛选压定为 150 mg/L G418。为了提高分化率,分化培养中的筛选压是 100 mg/L G418。

表 1 不同浓度 G418 对愈伤组织生长的影响

G418 浓度(mg/L)	0	25	50	75	100	150	200
两周后愈伤组织平均增长率(%)	1 200	1 105	953	732	630	381	352

## 2.2 抗性愈伤组织筛选及抗性植株的再生

在 150 mg/L G418 的选择培养基上,前 3~4 周内被转化的抗性细胞及对照都能缓慢生长,颜色上也没有明显区别。一般在 30~50 d,未转化的细胞停止生长,颜色发灰,失去光泽,而转化的细胞仍生长良好并形成突起,所以,筛选时间以 50 d 左右为宜。

选取对 G418 有抗性的胚性愈伤组织转入预分化培养基进行弱光培养,两周后再转入分化培养基上进行分化培养,1 周左右愈伤组织表面出现绿色芽点,等小芽长到 2 cm 高时,转入壮苗培养基(含 5 g/L 或 8 g/L NaCl)中继续进行抗性筛选及生根培养。本实验共接种 1 050 块胚性愈伤,其中抗性愈伤组织的有 151 块,抗性率为 14.6%。

分化培养后共获得 101 株 G418 抗性植株,其中 81 株接种在含 5 g/L NaCl 生根培养基中,20 株接种在含 8 g/L NaCl 生根培养基中。3 周后在含 5 g/L NaCl 生根培养基中,对照基本上死亡,81 株转化植株中有 76 株能够正常生长。而在含 8 g/L NaCl 生根培养基中的 20 株植株则不能正常生长,表现为新根少、根短,植株生长缓慢,叶片逐渐变黄,移栽后没有成活。该实验结果表明,在生根培养基中添加 NaCl 能够筛选出耐盐好的转基因植株,其 NaCl 添加浓度以 5 g/L 为宜。

## 2.3 PCR 检测结果

应用 PCR 方法对转化水稻植株和非转化水稻植株(对照)进行检测,其中,在壮苗培养基中生长正常的 76 株中,有 73 株扩增得到特异的片段,大小与从质粒中扩增得到的特异带相符,约为 1.5 kb(图 2);另 3 株和非转化水稻植株均未扩增出以上的特异 DNA 片段,初步证明外源 BADH 基因已转入水稻基因组中。

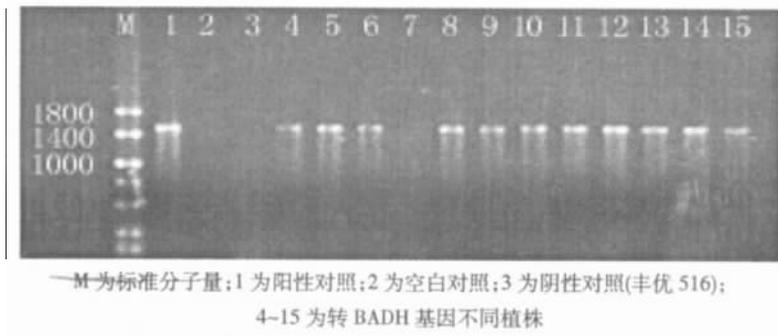


图 2 转 BADH 基因植株的 PCR 检测

### 3 讨 论

对转基因植株的耐盐筛选可采用不同的方法。本试验通过在壮苗培养过程中进行耐盐筛选,不但对培养过程产生的假阳性植株进行淘汰,同时也能去除转化中产生的嵌合体,减轻后续的 PCR 分子检测和抗盐性鉴定工作量。

对 G418 抗性苗在生根培养过程中进行耐盐筛选,当 NaCl 含量为 5 g/L 时,大部分转化苗基本能正常生长,对照全部枯死,说明转基因植株的耐盐能力普遍高于对照。当 NaCl 含量达到 8 g/L 时转化苗则生长不正常,这是由于培养基中的盐度过高,渗透压增加而造成植株失水过多,使组培苗长势弱,尽管表现出一定的耐盐性,但由于根系弱,导致移栽难以成活;另一方面也可能是由于转基因植株没有足够的耐盐能力。

高等植物中甜菜碱的生物合成是在植物叶绿体中进行的,甜菜碱由胆碱经两步氧化而成,中间产物是甜菜碱醛,这一过程涉及的第 1 个酶是胆碱单氧化物酶(CMO),第 2 个酶是甜菜碱醛脱氢酶(BADH)。因此,要进一步提高转基因植株的耐盐性,有必要将胆碱单氧化物酶和甜菜碱醛脱氢酶同时转入水稻中,以建立高效的甜菜碱调渗系统。

#### 参考文献:

- [1] 骆爱玲,等. 甜菜碱醛脱氢酶在菠菜叶细胞中的定位[J]. 植物生理学报,1995,21(2):117-1221.
- [2] 梁 峥,等. 干旱和盐胁迫诱导甜菜叶中的甜菜碱醛脱氢酶的积累[J]. 植物生理学报,1996,22(2):161-164.
- [3] Hiei Y, et al. Efficient Transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. The Plant Journal, 1994, 6(2): 271-282.
- [4] 王关林,方宏筠. 植物基因工程(2版)[M]. 北京:科学出版社,2002,8,742-744.
- [5] 肖 岗,陈受宜. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J]. 科学通报,1995,40(8):741-745.
- [6] Shimamoto K, et al. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts[J]. Nature, 1989, 338(16): 274-276.

## Production of Transgenic Rice with Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene

LIN Xiu-feng, LIU Zhi-ming

(Biotechnology Research Center Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province,  
Gongzhuling 136100, China)

**Abstract:** By using *Agrobacterium*-mediated transformation, the callus derived from mature embryos of rice variety "Fengyou 516" had been transformed with Betaine-aldehyde dehydrogenase from *Atriplex hortensis*. G418 resistant plants were obtained in this study and put in rooting culture containing 5g/L NaCl respectively. By using salt tolerance selection, resistant plants were obtained. PCR molecule testing indicated that 73 transgenic plants were salt tolerance.

**Key words:** Rice; BADH; Transformation; Salt tolerance