

农杆菌介导类胡萝卜素合成酶 基因 *LycB* 转化水稻的研究

抗艳红¹, 季静², 胡军³, 王罡²

(¹河北北方学院农林科技学院, 张家口 075131; ²天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072;

³吉林大学植物科学学院, 长春 130062)

摘要:以3个水稻品种成熟胚诱导的良好胚性愈伤组织为受体,以 *LycB* 为目的基因,应用根癌农杆菌介导法对水稻进行遗传转化,同时以抗性愈伤率为依据,对影响转化的几个因素进行优化研究。结果表明,预培养4d、侵染5~10min、农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 值 0.7~1.0、共培养2d有利于提高转化率。经潮霉素筛选获得的抗性植株经 PCR 和 PCR-Southern 分析鉴定,初步证明外源基因 *LycB* 已整合到水稻的基因组中。

关键词: *LycB* 基因; 水稻; 胚性愈伤组织; 根癌农杆菌; 遗传转化

Transfer of Para-carotene Biosynthesis Enzyme Gene (*LycB*) into Rice by *Agrobacterium Tumefaciens*

KANG Yan-hong¹, JI Jing², HU Jun³, WANG Gang²

(¹ College of Agriculture and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou 075131;

² School of Agriculture and Biological Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072;

³ College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062)

Abstract: Callus induced from mature embryos of 3 rice varieties were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation efficiency was affected by factors of pre-culture time, density of bacteria, duration for inoculation and co-cultivation. The transformation conditions were optimized with the combination of pre-culture of 4 days, infection in bacterium with OD₆₀₀ 0.7—1.0 for 5—10 minutes, followed by co-culture of 2 days. Plantlets with resistance to hygromycin were regenerated. PCR and PCR-Southern analysis on them confirmed the integration of the *LycB* be into the rice genome.

Key words: *LycB* gene; Rice; *Agrobacterium tumefaciens*; Embryonic callus; Genetic transformation

水稻是世界上最重要的禾谷类作物之一。但稻米胚乳中缺乏几种必需的营养素,最明显的是维生素 A 的前体(维生素 A 原)——β-胡萝卜素。维生素 A 作为人体所必需的微量营养成分,其缺乏会损害上皮细胞的生长发育。β-胡萝卜素的缺乏会导致夜盲症、角膜溃疡甚至失明。因此,利用转基因技术开发富含 β-胡萝卜素的水稻具有极大的现实意义^[1-5]。类胡萝卜素生物合成酶基因 *LycB* 是类胡萝

卜素生物合成过程中关键酶之一,位于合成途径的重要分枝点上^[1-2]。因此, *LycB* 对于 β-胡萝卜素的合成影响极大。本研究以水稻成熟胚诱导的胚性愈伤为受体材料,对其成熟胚组织培养和农杆菌介导转化的条件进行了研究,并通过农杆菌介导法将 *LycB* 基因导入水稻基因组中,以期提高稻米中 β-胡萝卜素含量,改善水稻品质。

收稿日期:2010-11-27 修回日期:2011-03-30

基金项目:国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设专项(J99-B-001);国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08003-019B, 2008ZX08003-005, 2008ZX08004-001)

作者简介:抗艳红,硕士,副教授,主要从事分子生物学及植物抗旱生量研究工作。E-mail:kyh2005@yeah.net

通讯作者:季静,博士,教授,研究方向为分子生物学。E-mail:jjjingwyr@163.com

1 材料与方

1.1 试验材料

供试品种包括秋光、富源、吉利 18、丰优 320、T12、吉丰 10、吉丰 32 和吉 01-124 等,均由吉林省农科院水稻研究所提供。

根癌农杆菌 EHA101、质粒 pEbisLycBHyg 由天

表 1 试验所用培养基

Table 1 Media used in the experiment

培养基 Media	组成 Composition
愈伤诱导培养基 Calli inducing medium	$N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 500 \text{ mg/L CH} + 3\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
分化培养基 (MS) Differentiation medium	$MS + 2.0 \text{ mg/L } 6 - BA + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 500 \text{ mg/L CH} + 500 \text{ mg/L Pro} + 0.1 \text{ mol Mannite} + 2\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
预培养基 Pre-culture medium	$N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 500 \text{ mg/L CH} + 500 \text{ mg/L Pro} + 0.3 \text{ mol Mannite} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
共培养基 Co-cultural medium	$1/4 N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 100 \mu\text{mol AS} + 1000 \text{ mg/L CH} + 3\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.4
重悬培养基 Suspending medium	$AA + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 100 \mu\text{mol AS} + 1000 \text{ mg/L CH} + 0.1 \text{ mol Mannite} + 2\% \text{ Sucrose}$, pH5.4
脱菌筛选培养基 ($N_6 D_2 H_1$) Screening medium	$N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 500 \text{ mg/L CH} + 500 \text{ mg/L Pro} + 30 \text{ mg/L Hyg} + 300 \text{ mg/L Cef} + 3\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
脱菌筛选培养基 ($N_6 D_2 H_2$) Screening medium	$N_6 + 2.0 \text{ mg/L } 2,4 - D + 600 \text{ mg/L CH} + 500 \text{ mg/L Pro} + 50 \text{ mg/L Hyg} + 100 \text{ mg/L Cef} + 3\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
筛选分化培养基 (MSH ₁) Screening differential medium	$MS + 2.0 \text{ mg/L } 6 - BA + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 500 \text{ mg/L CH} + 500 \text{ mg/L Pro} + 50 \text{ mg/L Hyg} + 0.1 \text{ mol Mannite} + 2\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
生根培养基 Rooting medium	$MS + 3\% \text{ Sucrose} + 0.8\% \text{ Agar}$, pH5.8
YEB 培养基 YEB medium	$5 \text{ g/L beef extract} + 5 \text{ g/L peptone} + 5 \text{ g/L Sucrose} + 10 \text{ g/L yeast extract} + 0.5 \text{ g/L MgSO}_4$

CH:水解酪蛋白;AS:乙酰丁香酮;Pro:脯氨酸;Cef:头孢霉素;Hyg:潮霉素

CH:Hydrolyzed casein;AS:Acetosyringone;Pro:Proline;Cef:Cefotaxime;Hyg:Hygromycin

1.3 不同水稻基因型成熟胚诱导率和分化率的研究

将供试 8 个水稻基因型的成熟种子用砂纸打磨去壳,挑选无病斑且饱满的种子各 150 ~ 200 粒,经 70% 乙醇处理 2min 后用 0.1% 升汞浸泡 20min,再用无菌水漂洗 3 次,用无菌滤纸吸干后接种于诱导培养基诱导愈伤产生,再转入分化培养基中分化出苗。统计各基因型的愈伤诱导率和分化率。选取愈伤诱导率和分化率较高的基因型作为遗传转化的材料。

1.4 水稻愈伤对抗生素敏感性试验

取同一培养时期相同大小的愈伤组织,接种到含潮霉素 (Hyg) 分别为 0、10、30、50、70mg/L 的诱导培养基上培养,每处理接种 3 个平皿。30d 后观察其对筛选剂的反应。

津大学农业与生物工程学院提供,质粒 pEbisLycBHyg 上构建有目的基因 *LycB* 和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt*, *LycB* 基因从黄花龙胆 (*Gentiana lutea*) 花瓣中获得^[2,5]。

1.2 培养基

用于试验的各种培养基组成成分见表 1^[6-7]。

1.5 农杆菌介导的水稻遗传转化因子的优化

以 8 个基因型中愈伤诱导率和分化率较高的吉丰 32、吉丰 10 和秋光为受体材料,以产生的抗性愈伤率为依据,设置预培养时间、侵染时间、农杆菌菌液浓度、共培养时间 4 个因子试验,预培养时间设置 4 个处理 (0、2、4、6d);侵染时间设 4 个梯度 (5、10、20、30min);共培养时间 4 个水平 (2、3、4、5d);农杆菌菌液浓度 OD_{600} 值分别为 0.1、0.5、0.7、1.0、2.0;以上每一处理接种愈伤 45 块,3 次重复。并进一步对吉丰 10 在不同试验条件下的抗性愈伤率作方差分析。

1.6 农杆菌介导的转化与抗性筛选

水稻盾片处产生的良好胚性愈伤剥离转移到预培养基上预培养 4d,然后用制备好的农杆菌菌液浸泡 5 ~ 10min,期间轻轻摇动 1 ~ 2 次,以使充分接触。

侵染好的愈伤组织用灭菌滤纸吸去多余菌液,然后转入共培养基黑暗下共培养,共培养基中加 100 μ mol 浓度的乙酰丁香酮^[8]。共培养后愈伤组织用含 20g/L 甘露醇的无菌水冲洗并在此溶液(另加 500mg/L cef)浸泡 30min 后,灭菌滤纸吸干,转移到脱菌筛选培养基 N₆D₂H₁ 培养,14d 后,再转入筛选培养基 N₆D₂H₂ 培养 14d,温度 25℃。培养时以未作转化的材料为对照。所得抗性愈伤转入分化培养基 MSH₁ 中,每天光照 16h,待抗性小苗长出来后,再转入 MS 生根培养基中生根。将草碳土在高压灭菌锅中 125℃ 灭菌 45min,加入无菌水后将抗性苗移栽其中成活。

1.7 分子检测

取抗性植株和未转化对照植株叶片按照王关林等^[9]的 SDS 方法提取植物基因组 DNA。

以从抗性植株和未转化对照植株叶片提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增检测,引物为:P1 5'-CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGATCCATGG-ATACTTTAGTGAAAACCTCCA-3' 和 P2 5'-GCGGC-CGCTTA-TTCTTTGTCCCGCAATAAGTT-3'。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 2min,后 94℃ 变性 1min、61℃ 退火 1min、72℃ 延伸 2min,30 个循环,72℃ 再延伸 10min,最后 4℃ 保温。取 5~10 μ l PCR 扩增产物 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

探针标记。采用碱裂解法提取质粒 pEbisLycBHyg,应用北京鼎国生物技术发展中心 DNA 片段快速纯化与回收试剂盒回收所提质粒扩增出

的特异 DNA 片段的琼脂糖凝胶,然后采用地高辛标记和检测试剂盒以随机引物法标记探针并检测。

PCR-Southern 检测。在凝胶上依次加入 M、阳性质粒对照、未转化植株阴性对照、抗性植株 PCR 扩增样品,电泳检测后用电洗脱的方法进行膜转移,用已标记好的探针按照地高辛标记和检测试剂盒说明进行 PCR-Southern 检测。

2 结果与分析

2.1 不同水稻基因型成熟胚诱导率和分化率的研究

8 个基因型水稻的愈伤诱导率和分化率见表 2,结果表明,不同基因型的诱导率、分化率有较明显差别。其中吉丰 32、秋光、吉丰 10、富源、T12 出愈率都在 80% 以上,吉丰 32、吉丰 10 和秋光出愈率在 8 个基因型中较高,在 85% 以上,可作为转化受体;而 T12 的出愈率虽最高但分化率偏低。吉 01-124 和吉利 18 的出愈率和分化率都较低,出愈率在 60% 以下,分化率不及 20%。另外,各个基因型在培养基上产生的愈伤颜色和状态也不同,秋光、富源等产生的愈伤为黄色、致密、整块状,而吉丰 10 和吉丰 32 等产生的愈伤则为乳白色疏松颗粒状的良好胚性愈伤^[10];而吉 01-124 产生的愈伤质量较差,成水渍状,且培养 30~60d 后有部分愈伤会变褐死亡。故选择吉丰 32、秋光、吉丰 10 等 3 个基因型作为农杆菌介导的遗传转化受体。

表 2 不同基因型对水稻成熟胚愈伤组织诱导与分化率的影响

Table 2 Effects of different genotype on the frequency of callus initiation and differentiation in rice mature embryos

基因型 Genotype	出愈率 (%) Callus rate	分化率 (%) Differentiation rate	基因型 Genotype	出愈率 (%) Callus rate	分化率 (%) Differentiation rate
秋光	86.5	46.9	吉利 18	56.1	16.3
丰优 320	72.5	36.8	吉丰 10	85.5	51.5
T12	87.1	26.5	富源	80.0	36.3
吉 01-124	60.0	6.0	吉丰 32	87.5	43.3

2.2 水稻愈伤组织筛选剂潮霉素浓度的确定

转化植株的抗性筛选是获得转基因植株的关键。如果筛选压力过高,那么转基因植株会死亡;反之,则会出现大量的假阳性抗性植株,为后续筛选工作带来麻烦。所以,确定植株的适宜筛选浓度十分重要。秋光、吉丰 10 和吉丰 32 愈伤组织对潮霉素

敏感反应结果见表 3。从表中可以看出各供试基因型在 30 mg/L Hyg 时被抑制的效果明显。秋光对潮霉素最敏感,吉丰 10 次之。所以愈伤组织侵染转化后,先在 30mg/L Hyg 的较低选择压的筛选培养基 N₆D₂H₁ 培养再转入 50mg/L Hyg 的较高选择压的筛选培养基 N₆D₂H₂ 筛选。

表3 不同基因型水稻对潮霉素敏感反应

Table 3 Hygromycin sensitivity of different rice species

基因型 Genotype	Hyg 浓度 (mg/L) Hyg concentration				
	0	10	30	50	70
秋光	A	C	D	D	D
吉丰 10	A	B	C	D	D
吉丰 32	A	B	C	C	D

A: 正常生长, 愈伤黄色; B: 生长缓慢, 愈伤发灰, 失去光泽; C: 停止生长, 愈伤成黄褐色; D: 死亡, 愈伤完全褐化

A: The callus's color is yellow and grow normally; B: The callus's color is gray and grow slowly; C: The callus's color is brown and stop growth; D: The callus's color is brown completely and die

2.3 农杆菌介导的水稻遗传转化因子的优化

2.3.1 农杆菌菌液浓度对水稻抗性愈伤率的影响

以3个不同基因型水稻成熟胚诱导的愈伤为受体, 在侵染8min、共培养3d、预培养2d的条件下^[6,11-12], 对不同浓度农杆菌菌液进行侵染试验(图1)。菌液OD₆₀₀值为0.1~1.0时, 抗性愈伤诱导率呈上升趋势, OD₆₀₀值为1.0时抗性愈伤诱导率达最高; 而当农杆菌菌液浓度继续增加时, 抗性愈伤诱导率又显著下降。以吉丰10为材料, 方差分析可知,

表4 预培养时间、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间对吉丰10抗性愈伤率的影响

Table 4 The effect of preculture time, *Agrobacterium* concentration, infection and coculture time on the frequency of resistant callus of Jifeng 10

菌液浓度(OD ₆₀₀) <i>Agrobacterium</i> concentration	抗性愈伤率(%) Frequency of resistant callus	侵染时间(min) Infection time	抗性愈伤率(%) Frequency of resistant callus	共培养 时间(d) Co-culture time	抗性愈伤率(%) Frequency of resistant callus	预培养 时间(d) Pre-culture time	抗性愈伤率(%) Frequency of resistant callus
1.0	67.9aA	10	67.0aA	3	72.3aA	6	69.7aA
0.7	57.7abA	5	62.4abA	2	66.5aA	4	68.5aA
0.5	54.1bA	20	57.9abA	4	38.5bB	2	57.1aA
0.1	35.9cB	30	55.8bA	5	14.2cC	0	36.8bA
2.0	30.7cB	-	-	-	-	-	-

小写字母和写字母分别表示0.05和0.01水平差异显著

Letters in small and in capital mean significant difference at 0.05 and 0.01 level respectively

2.3.2 侵染时间对水稻抗性愈伤率的影响 以3个不同基因型水稻成熟胚诱导的愈伤为受体, 在菌液浓度OD₆₀₀值为1.0、共培养3d、预培养2d的条件下, 对侵染时间进行试验, 侵染时间对水稻抗性愈伤率的影响如图2所示, 随着侵染时间的增加, 3个不同基因型水稻抗性愈伤率有一定的变化。吉丰10和秋光侵染10min抗性愈伤率较高, 分别为66.6%和55.6%, 吉丰32侵染20min抗性愈伤率较高, 为62.4%。方差分析可知, 不同侵染时间下吉丰10抗

不同农杆菌菌液浓度对水稻抗性愈伤的产生有极显著差异($F = 29.28 > F_{0.01} = 6.63$)。显著性测验(表4)表明, 菌液OD₆₀₀值为0.1和2.0的抗性愈伤率都极显著低于另外3个水平, 1.0和0.7两个水平的抗性愈伤率最高且差异不显著。所以较适宜的菌液OD₆₀₀值为0.7~1.0。

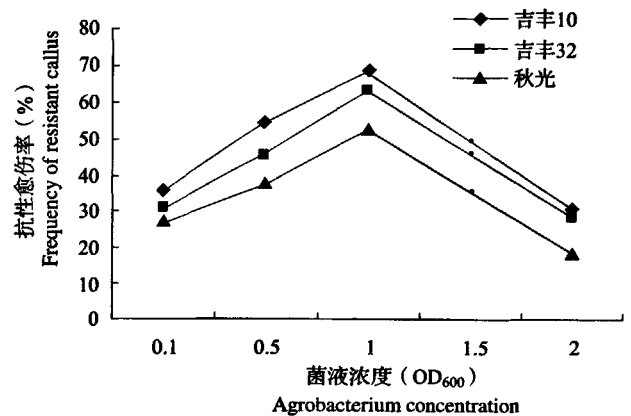


图1 菌液浓度对抗性愈伤率的影响

Fig. 1 The effect of *Agrobacterium* concentration on the frequency of resistant callus

性愈伤率差异显著($F = 6.53 > F_{0.05} = 4.76$)。显著性测验(表4)可知, 水稻愈伤适宜的侵染时间为5~10min。

2.3.3 共培养时间对水稻抗性愈伤率的影响 吉丰10、吉丰32、秋光的愈伤组织经预培养2d、OD₆₀₀值为1.0的菌液侵染10min后, 在共培养基上分别共培养2d、3d、4d、5d, 14~21d后统计抗性愈伤率(图3)。图3表明, 共培养2d、3d, 抗性愈伤率呈上升趋势, 而共培养4d、5d的抗性愈伤率明显下降。

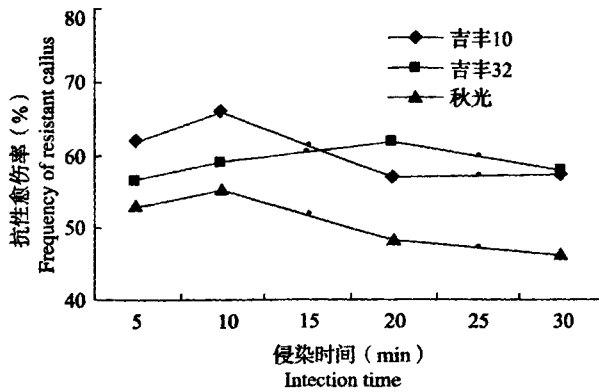


图2 侵染时间对抗性愈伤率的影响

Fig. 2 The effect of Infection time on the frequency of resistant callus

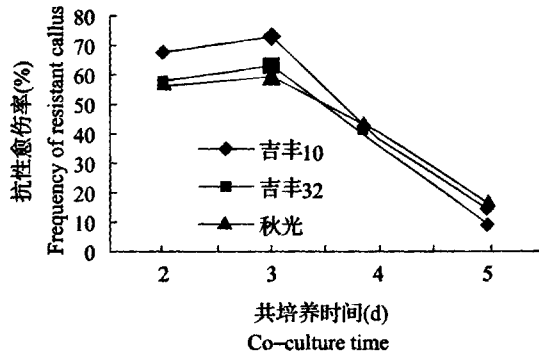


图3 共培养时间对抗性愈伤率的影响

Fig. 3 The effect of cocultivation time on the frequency of resistant callus

共培养时间对吉丰 10 抗性愈伤率存在显著影响 ($F = 45.23 > F_{0.01} = 9.78$)。差异显著性测验(表 4)表明,共培养 3d 抗性愈伤率显著高于 4d、5d。但共培养 2d 和 3d 二者之间的抗性愈伤率无显著性差异。当共培养 3d 以上时,造成后续的抑菌筛选困难。另外,长时间使用抑菌剂对水稻愈伤的生长有毒害作用。因此,水稻愈伤组织与农杆菌的共培养最佳时间为 2d。

2.3.4 预培养时间对水稻抗性愈伤率的影响 以吉丰 10、吉丰 32、秋光 3 个不同基因型水稻成熟胚诱导的愈伤为受体,进行不同预培养时间处理试验,而后在 $OD_{600} = 1.0$ 的菌液中侵染 10min、共培养 3d, 14~21d 后统计抗性愈伤率(图 4)。结果表明,随着预培养时间的增加,3 个基因型水稻的抗性愈伤率都有增加的趋势。当然,各抗性愈伤率由于基因型的差异也存在较大差异。同一处理,吉丰 10 抗性愈伤率较高,秋光抗性愈伤率较低。对吉丰 10 在

不同预培养时间下侵染后的抗性愈伤率进行方差分析得出 $F = 12.9 > F_{0.01} = 9.78$,说明不同预培养时间对水稻抗性愈伤的产生有极显著影响。从表 4 可知,经过 2~6d 预培养的抗性愈伤率显著高于未经预培养产生的抗性愈伤率,但预培养 2d、4d、6d 的抗性愈伤率均无显著差异。出于时间和效率的考虑,选择预培养时间为 4d。

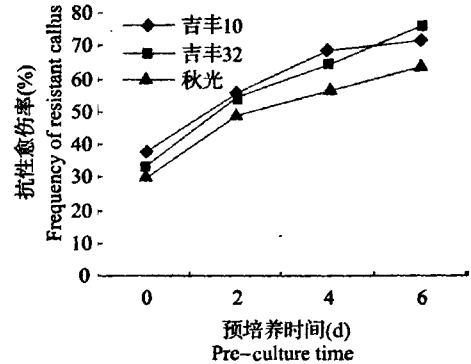


图4 预培养对抗性愈伤率的影响

Fig. 4 The effect of preculture on the frequency of resistant callus

2.4 抗性植株的获得

水稻成熟种子在诱导培养基上 28d 诱导出淡黄色愈伤组织(图 5-A),可用作转化试验的受体材料。在上述各种确定的因素下,被根癌农杆菌感染后的愈伤组织转移到筛选培养基上 28d,少数愈伤组织状态较好,继续生长,而大多数愈伤组织变褐并逐渐死亡(图 5-B)。将抗性愈伤组织转到筛选分化培养基上,部分愈伤组织的表面会产生绿点,少数绿点可分化成绿芽(图 5-C)。待绿芽长到 1~2cm,转移到生根培养基中,生根培养基上的植株在 7d 内能长出幼根,约 30d 会有 5~8 条根生成,根较粗壮时,移栽植株(图 5-D)。共获得水稻抗性苗 11 株(表 5),其中吉丰 10 得到 8 株,吉丰 32 得到 3 株,秋光没有得到抗性苗。

2.5 抗性植株的 PCR 检测

从抗性植株和未转化对照植株叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,未转化植株为阴性对照,质粒 pEbisLycBHyg 为阳性对照。电泳结果表明,吉丰 32 获得 PCR 阳性植株 1 株,吉丰 10 获得 PCR 阳性植株 3 株。PCR 阳性植株和质粒都在 1.5kb 附近扩增出特异条带,而阴性对照植株却未扩增出相应的特异条带(图 6),由此初步证实,目的基因 *LycB* 已转入到水稻中。

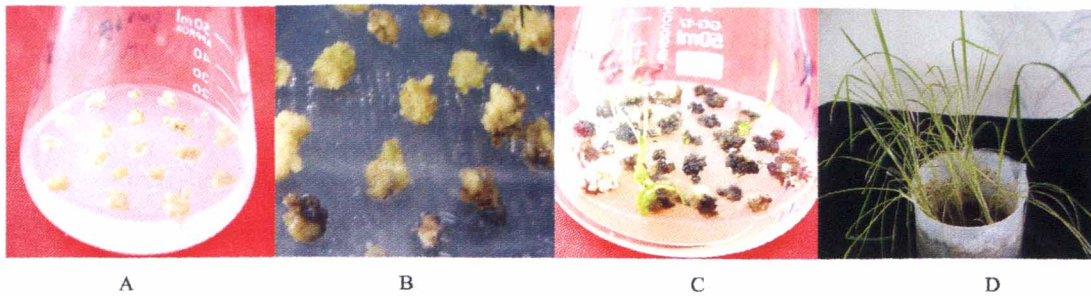


图5 水稻转化植株获得的过程

Fig. 5 Production stages of transgenic rice

A: 诱导 28d 后水稻成熟胚的愈伤组织; B: 愈伤组织在筛选培养基中筛选 28d;
C: 筛选分化培养基中 28d 愈伤组织的分化; D: 移栽的的转化水稻

A: Callus induced by mature seed for 28d; B: Transformed callus selected on screening regeneration medium for 28d; C: Green buds gained in differential medium; D: Transformed plants

表5 农杆菌介导法转化水稻获得的抗性植株

Table 5 The schedule of resistant plant obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation in rice

基因型 Genotype	接种愈伤数 No. of callus incubated	抗性愈伤数 No. of resistant callus	出苗数 No. of regeneration plant	抗性愈伤率(%) Resistant callus rate	出苗率(%) Regeneration rate	抗性苗率(%) Resistant plant rate
吉丰 32	206	155	3	75.2	2.0	1.5
吉丰 10	248	202	8	81.5	4.0	3.2
秋光	223	156	0	59.9	0	0

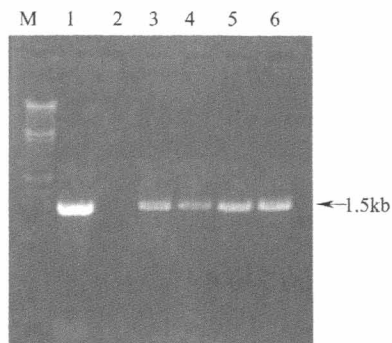


图6 水稻转基因植株的 PCR 检测

Fig. 6 PCR detection of transformed Rice

M: λ DNA/EcoRI + HindIII; 1: 阳性质粒对照;

2: 未转化植株; 3~6: 转化植株

M: λ DNA/EcoRI + HindIII; 1: positive comparison;

2: untransformed plant; 3-6: transformed plant

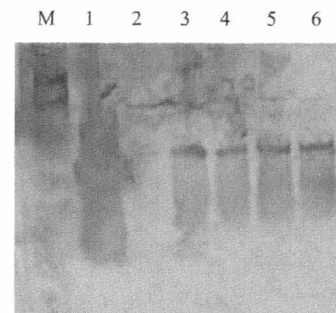


图7 水稻转基因植株的 PCR-Southern 检测

Fig. 7 PCR-Southern detection of transformed

M: λ DNA/EcoRI + HindIII; 1: 阳性质粒对照;

2: 未转化植株; 3~6: 转化植株

M: λ DNA/EcoRI + HindIII; 1: positive comparison;

2: untransformed plant; 3-6: transformed plant rice

2.6 转基因植株 PCR-Southern blot 检测

对 4 株 PCR 阳性植株提取基因组 DNA 进行 PCR-Southern 检测(图 7), 结果表明, PCR 阳性植株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段均有杂交信号且处于同一位置, 而阴性对照植株则没有杂交信号, 说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带, 证明 *LycB* 基因已整合进水稻抗性植株基因组中。

3 讨论

3.1 水稻组织培养与遗传转化对基因型的依赖性

由于组织培养基基因型的依赖性^[6], 使得在其他相同因素下, 遗传转化表现出明显的基因型差异。选择良好的转化基因型是转基因能否成功的关键。本研究利用水稻成熟胚诱导出良好的胚性愈伤, 生长旺盛, 分化能力强, 易再生。从供试 8 个水稻基因

型中挑选了愈伤诱导率和分化率都较好的吉丰 10、吉丰 32 和秋光作为遗传转化的受体。获得旺盛的胚性细胞是提高转化效率的重要保障,而这依靠培养条件的优化,其中培养基的成分起着关键作用。本试验以 N6、MS 为基本培养基,采用附加其他物质如水解酪蛋白、脯氨酸、甘露醇、各种激素配比来调整愈伤组织培养基^[13-14],可使愈伤组织生长至良好、适于转化的生理状态。

3.2 农杆菌转化过程中各种参数的优化

影响农杆菌转化的因素很多,除基因型的选择、受体组织状态外,适宜的菌体浓度、浸泡时间和共培养的时间也是提高转化率的关键^[6,14-15]。若侵染时所用农杆菌浓度过大、浸泡时间过长、共培养时间过长都会对愈伤组织造成不同程度的伤害,同时还会造成农杆菌过度生长,给后续的脱菌工作带来困难。反之,如果菌液浓度过低、浸泡时间过短,农杆菌就不能很好地吸附到细胞表面,若共培养时间不够,T-DNA 转移过程则不能完成。本试验选择侵染能力强的根癌农杆菌 EHA101,以抗性愈伤率作为依据,结果发现预培养 4d,侵染时间 5~10min,农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 值为 0.7~1.0,共培养时间 2d 对转化最为有利。以上条件的优化为本研究获得转化植株打下了很好的基础。

3.3 转基因植株的检测方法

本研究在 DNA 水平提供了转基因植株分子检测的证据。将 *LycB* 基因导入水稻,最终目的是研究稻米中 β -胡萝卜素含量是否提高,稻米的品质是否得到了改善。由于外源基因在转化后代中表达的不确定性和基因沉默等现象的存在,对于转化的 *LycB* 基因能否在水稻中稳定遗传和高效表达以及转 *LycB* 基因水稻的 β -胡萝卜素含量的变化还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ye X, Al-Babili S, Klott A, et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm [J]. *Science*, 2000, 287: 303-305
 - [2] 季静, 山村三郎, 西原昌宏, 等. 通过转基因提高 β -胡萝卜素生物合成量 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004 (4): 440-444
 - [3] 郑阳霞, 杨婉身, 季静, 等. 类胡萝卜素生物合成相关基因的克隆及其遗传工程的研究进展 [J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 17(3): 442-446
 - [4] 王玉萍, 刘庆昌, 翟红. 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(1): 103-110
 - [5] Zhu C F, Yamamura S, Koiwa H, et al. cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in *Gentiana lutea* [J]. *Plant mol Biol*, 2002, 48: 277-285
 - [6] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J*, 1994, 6: 271-282
 - [7] Chen En H, Zhang P, Zuo S M, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency in rice [J]. *Rice Sci*, 2004, 6(4): 181-185
 - [8] 朱晋云, 许玉娟, 杨丽萍, 等. 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(1): 84-89
 - [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 386-389
 - [10] Dong J J, Teng W M, Buchholz W G, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of javanica rice [J]. *Mol Breedi*, 1996, 2: 267-276
 - [11] 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 等. 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(3): 320-325
 - [12] Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 727-730
 - [13] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. *植物生理学报*, 1998, 8(3): 259-271
 - [14] Zhao Z Y, Cai T, Tagliani L, et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation [J]. *Plant mol Biol*, 2000, 44: 789-798
 - [15] Liu Y H, Yu J J, Ao G M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 5(7): 531-536
- ~~~~~
- (上接第 604 页)
- [8] 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测 [J]. *棉花学报*, 2000, 12(5): 267-269
 - [9] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice cosmose [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 148-149
 - [10] Rong J K, Abbey C, Bowers J E, et al. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*) [J]. *Genetics*, 2004, 166: 389-417
 - [11] Park Y H, Alabady M S, Ulloa M, et al. Genetic mapping of new cotton fiber loci using EST-derived microsatellites in an interspecific recombinant inbred line cotton population [J]. *Mol Genet Genom*, 2005, 274: 428-441
 - [12] Lacape J M, Nguyen T B, Brigitte C, et al. QTL analysis of cotton quality using multiple *Gossypium hirsutum* \times *Gossypium barbadense* backcross generations [J]. *Crop Sci*, 2005, 45: 123-140
 - [13] Han Z G, Wang C B, Song X L, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112(3): 430-439
 - [14] Guo W Z, Cai C P, Wang C B, et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map reveals genome structure, function, and evolution in *Gossypium* [J]. *Genetics*, 2007, 176: 527-541
 - [15] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 37-38
 - [16] Guo W Z, Zhang T Z, Zhu X F, et al. Modified Backcross Pyramiding Breeding with Molecular Marker-Assisted Selection and Its Applications in Cotton [J]. *Acta Agro Sini*, 2005, 31(8): 963-970
 - [17] 王心宇, 陈佩度, 张守忠. 小麦白粉病抗性基因的聚合及其分子标记辅助选择 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(7): 640-646
 - [18] 柳李旺, 朱协飞, 郭旺珍, 等. 分子标记辅助选择聚合棉花 Rf1 育性恢复基因和抗虫 Bt 基因 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 48-52

农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因LycB转化水稻的研究

作者: [抗艳红](#), [季静](#), [胡军](#), [王罡](#), [KANG Yan-hong](#), [JI Jing](#), [HU Jun](#), [WANG Gang](#)
作者单位: [抗艳红, KANG Yan-hong \(河北北方学院农林科技学院, 张家口, 075131\)](#), [季静, 王罡, JI Jing, WANG Gang \(天津大学农业与生物工程学院, 天津, 300072\)](#), [胡军, HU Jun \(吉林大学植物科学学院, 长春, 130062\)](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) 
英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)
年, 卷(期): 2011, 12(4)

参考文献(15条)

1. [Liu Y H;Yu J J;Ao C M Factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of foxtail millet \(Setaria italica\) 2007\(07\)](#)
2. [Zhao Z Y;Cai T;Tagliani L Agrobacterium-mediated sorghum transformation \[外文期刊\] 2000](#)
3. [刘巧泉;张景六;王宗阳 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 1998\(03\)](#)
4. [Rashid H;Yokoi S;Toriyama K Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice 1996](#)
5. [Chen En H;Zhang P;Zuo S M Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation efficiency in rice 2004\(04\)](#)
6. [Hiei Y;Ohta S;Komari T Efficient transformation of rice \(Oryza sativa L.\) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA \[外文期刊\] 1994](#)
7. [Zhu C F;Yamamura S;Koiwa H cDNA cloning and expression of carotenogenic genes during flower development in Gentiana lutea \[外文期刊\] 2002](#)
8. [王玉萍;刘庆昌;翟红 植物类胡萝卜素生物合成相关基因的表达调控及其在植物基因工程中的应用 2006\(01\)](#)
9. [郑阳霞;杨婉身;季静 类胡萝卜素生物合成相关基因的克隆及其遗传工程的研究进展 2006\(03\)](#)
10. [季静;山村三郎;西原昌宏 通过转基因提高β-胡萝卜素生物合成量 2004\(04\)](#)
11. [Ye X;Al-Babili S;Kloti A Engineering the provitamin A \(β-carotene\) biosynthetic pathway into \(carotenoid-free\) rice endosperm \[外文期刊\] 2000](#)
12. [于娅;刘莉莎;赵永钦 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究 2010\(03\)](#)
13. [Dong J J;Teng W M;Buchholz W G Agrobacterium-mediated transformation of javanica rice 1996](#)
14. [王关林;方宏筠 植物基因工程 2002](#)
15. [朱晋云;许玉娟;杨丽萍 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究 2008\(01\)](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201104020.aspx