

TAC 载体介导温敏不育水稻的遗传转化

姜大刚, 付 晓, 柳忠玉, 庄楚雄

(华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 选用两系杂交稻的母本——温敏不育系籼稻 *Oryza sativa* 品种安农 S-1、安湘 S 和香 125S 为试验材料, 对这 3 个品种的组织培养特性进行了研究. 结果表明: 香 125S 的胚性愈伤组织最容易形成, 状态也最好. 以含有 50 kb 水稻基因组片段的 TAC27 克隆 (GLA40) 和农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株 LBA4404 组合, 转化水稻胚性愈伤组织, 获得了大量转化苗, 通过潮霉素溶液浸泡试验, 全部转化苗均表现抗性; PCR 检测, 证明 TAC27 所携带的 50 kb 的外源片段已经完整地整合到水稻基因组上.

关键词: 水稻; 温敏不育系; 愈伤组织; 转化

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 03-0052-04

The genetic transformation of thermo-sensitive male sterile rice mediated by TAC vector

JIANG Da-gang, FU Xiao, LIU Zhong-yu, ZHUANG Chu-xiong

(College of Life Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The comparison of callus induction, multiplication and medium were conducted with three thermo-sensitive genetic male sterile rice varieties, Annong S-1, Anxiang S, Xiang 125S. The results showed that Xiang 125S was the best healthy variety among the three varieties in the term of formation of embryogenic calli. The embryogenic calli were infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring the TAC27 (transformation-competition artificial chromosome 27) plasmid with rice insertion from Guanglu ai4 genome library (GLA40). The regenerated plants were resistant to hygromycin. The results of PCR analysis indicated that the 50 kb foreign fragment were integrated into the rice genome.

Key words: *Oryza sativa*; thermo-sensitive genetic male sterile line; callus; transformation

温敏不育水稻 *Oryza sativa* 是一种重要的种质资源, 安农 S-1 是我国特有的温敏核不育系, 由它转育的温敏核不育系香 125S 和安湘 S 等所配置的两系杂交种香两优 68 (D68)、八两优一百、安两优 25 等已经在生产上大面积推广^[1]. 但是, 由于该类材料的育性易受环境因素的影响而不稳定, 其临界温度又往往发生漂移, 并逐年升高, 从而限制了两系法育种的大规模发展. 克服这些不足的一条途径就是克隆光温敏不育基因, 进而了解其变异和表达的特点, 阐明光温敏不育的机理, 从而更好地利用该珍贵的种质资

源. 利用图位克隆技术克隆该基因是一种良好的策略, 其步骤是首先要对该基因进行精细定位, 找到候选克隆, 将含有目的基因的 DNA 片段组装到合适的载体上, 转化水稻, 进行功能互补试验. 目前, 既可以克隆大片段 DNA, 又可以借助于农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 进行植株遗传转化的载体系统有 BiBAC 系统^[2] 和 TAC (transformation-competition artificial chromosome) 系统^[3], 其中, 应用 TAC 载体系统, 已经成功地克隆了拟南芥 *Sgr* 等多个基因^[3~5], 构建了拟南芥^[3]、水稻^[6] 和小麦^[7] 等多个基因组文库; 基于 TAC

收稿日期: 2004-09-01

作者简介: 姜大刚 (1977-), 男, 助教, 硕士. 通讯作者: 庄楚雄 (1964-), 男, 研究员, 博士;

E-mail: zhuangcx@scau.edu.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2002AA224121); 国家自然科学基金资助项目 (30080019)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

载体的粳稻的高频再生转化体系也已建立^[8],但是,鲜见有基于该载体籼稻转化体系的报道,加之籼稻在我国农业生产上举足轻重的地位,因而基于 TAC 载体的籼稻的高频再生体系的建立就极为迫切。本研究中,以温敏核不育系水稻品种安农 S-1,安湘 S 和香 125S 为材料,探索适合其各自特点的组织培养条件,利用经过改良的更适合单子叶植物转化的 TAC 载体 TAC27 介导,成功地把来源于水稻的约 50 kb 的外源片段导入水稻基因组中,为水稻品种的遗传改良和温敏不育基因的克隆奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

温敏核不育系籼稻品种安农 S-1、安湘 S、香 125S,以成熟种子作为外植体。

1.2 农杆菌菌株及质粒

农杆菌菌株 LBA4404 为本实验室保存;转化用的 TAC 克隆 GLA40 来源于籼稻品种广陆矮 4 号基因组文库,构建文库所使用的质粒载体为 TAC27,基因组文库和载体由华南农业大学遗传工程研究室刘耀光研究员提供。

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织诱导和继代 选取饱满、无虫害的安农 S-1、安湘 S、香 125S 成熟种子,用 $\varphi=70\%$ 的乙醇消毒 1 min,蒸馏水冲洗 3 次,再用有效成分为 15 g/L 的 NaClO 浸泡 20 min,蒸馏水冲洗多次,取出,放在铺有滤纸的培养皿上晾干,将种子接种于不同的诱导培养基上,20 d 左右继代 1 次。

1.3.2 植物培养基 使用对籼稻培养效果较好的 MB 培养基:MS 大量+B₅ 微量+B₅ 有机+30 g/L 蔗糖+500 mg/L 谷氨酰胺+500 mg/L 脯氨酸+300 mg/L 水解酪蛋白+2 mg/L 2,4-D+3.0 g/L phytagel, pH 5.8; 筛选培养基:MB 基本培养基+40 mg/L 潮霉素+200 mg/L 头孢霉素+200 mg/L 的羧苄青霉素; 预分化培养基:MB 基本培养基+ABA 5 mg/L+CuSO₄·5H₂O 2.5 mg/L+6-BA 5 mg/L+NAA 1 mg/L; 分化培养基:MB 基本培养基+6-BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L; 生根培养基:1/2MS 基本培养基+NAA 1 mg/L; 共培养:MS 大量+B₅ 微量+B₅ 有机+30 g/L 麦芽糖+2 g/L 肌醇+300 mg/L 水解酪蛋白+2 mg/L 2,4-D+3.0 g/L phytagel, pH 5.5。

1.3.3 电激法转化农杆菌及 TAC 质粒插入片段大小分析 按 Liu 等^[3]的方法进行质粒转化农杆菌。用 Hind II 酶切含插入外源片段的 TAC27 质粒,8 g/L 琼脂糖凝胶电泳,分析插入片段大小。

1.3.4 农杆菌的培养及水稻愈伤组织浸染 农杆菌单菌落涂布于 YM(加卡那霉素和链霉素)培养基上,28℃暗培养 2~3 d,收集菌体加入到共培养液体培养基中,使菌液 D_{550nm} 值为 0.5 左右。将挑选好的愈伤组织转入菌液中浸染 20 min,期间摇动几次,取出愈伤组织,用灭菌滤纸吸干多余的菌液后,接到共培养培养基上,26℃,暗培养 2~3 d。

1.3.5 转化子的筛选与植株再生 共培养后的愈伤组织干燥 1~2 d,接入筛选培养基,筛选 2 次,每次 20 d 左右,抗性愈伤组织经过预分化、分化、生根、壮苗,移入温室种植。按照 Li 等^[9]的方法进行。

1.3.6 再生植株叶片的潮霉素溶液浸泡试验 剪取再生植株叶片约 2~3 cm,立即浸入潮霉素溶液中,质量浓度为 40 mg/L,为保持叶片的离体活性,加入 $\rho=1$ mg/L 的 BA,具体方法参见刘巧泉等^[10]的方法,观察转化苗和对照叶片的变化情况。

1.3.7 PCR 检测 取几株 T₀ 代潮霉素溶液抗性的转基因植株按 Clark^[11]的方法抽提基因组 DNA,同时设置阴性对照及阳性对照,分别扩增 *hpt* 基因和 *SacB* 基因,扩增产物用 $\rho=8$ g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 引物:

hpt 基因: 5'TCCGAGCCTCCGCTCGAAGTAG3'
5'CTGAAGTCACCGCGACGTCGTCTC3';
SacB 基因: 5'CGCATTACCTGTTATCCCTA3'
5'GGTTCAGAACCGGACCATTC3'。

2 结果与分析

2.1 TAC 质粒农杆菌转化、鉴定

从广陆矮 4 号 TAC27 基因组文库中随机挑取 1 个克隆 GLA40,抽提质粒并用电激转化法转到农杆菌 LBA4404 中,经过多次继代培养,再抽提农杆菌转化子的质粒,重新导入大肠杆菌,抽提质粒 DNA, Hind II 酶切,电泳分析的结果(图 1)显示,转化前后质粒带型一致,说明 TAC 质粒在农杆菌中稳定遗传。电泳分析表明插入片段大约 50 kb。

2.2 不同水稻品种的愈伤组织诱导率及状态的比较

本实验室经过比较多种培养基的组合试验数据发现,所选用的 3 个品种,使用 MB 培养基对愈伤组织的诱导和继代,效果较好。将成熟胚接种于 MB 培养基,以观察不同水稻品种所形成愈伤组织状态。结果见表 1,对于试验所用的 3 个水稻品种,使用 MB 培养基愈伤组织状态较好,各品种之间愈伤组织差别不明显,比较之下,香 125S 愈伤组织状态最好,颗粒适中,淡黄色,干爽,是遗传转化的优良的外植体。



1: λ / *Hind* III marker; 2: 抽提自大肠杆菌的 GLA40 质粒; 3: 农杆菌质粒重新导入大肠杆菌后的 GLA40 质粒

1: λ *Hind* III marker; 2: TAC-GLA40 extracted from *E. coli*; 3: TAC-GLA40 extracted from *E. coli* after re-transformation with the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid

图 1 TAC 克隆 GLA40 用 *Hind* III 酶切电泳结果

Fig. 1 Restriction analysis of TAC clones GLA40 plasmid DNA was digested with *Hind* III

表 1 3 个水稻品种愈伤组织状态

Tab. 1 Callus state of the three rice varieties

水稻品种	培养基种类	愈伤组织状态
rice variety	medium	callus status
安农 S-1 Anmong S-1	MB	颗粒较小, 颜色浅, 较干爽
安湘 S Anxiang S	MB	颗粒大, 淡黄色, 干爽
香 125S Xiang 125S	MB	颗粒适中, 淡黄色, 干爽

将成熟种子接入诱导培养基, 观察愈伤组织诱导率和胚性愈伤组织的形成数. 结果表明, 在所选用的 3 个水稻品种中, 只有少数的种子不能诱导出愈伤组织, 并且, 愈伤组织差别不明显, 呈颗粒状, 颜色淡黄, 干爽, 质地紧密, 愈伤组织诱导率均在 90% 以上, 安农 S-1 略高些, 为 98%, 香 125S 略低些, 为 90%; 愈伤组织继代培养, 胚性愈伤组织的形成数(继代成功率), 香 125S 明显地高于安农 S-1 和安湘 S, 香 125S 为 80%, 而安湘 S 仅为 54.7%, 安农 S-1 为 51.0%(表 2).

表 2 不同水稻品种愈伤组织诱导率的比较

Tab. 2 Comparison of callus introduction of different varieties

水稻品种	外植体	外植体	愈伤组织	胚性愈伤组织
rice	种类	数目 No.	诱导率 rate	形成数 ¹⁾ No. of
variety	explant	of explant	of callus	embryogenic
			induction/ %	callus
安农 S-1 Anmong S-1	成熟胚	100	98	50(51.0%)
安湘 S Anxiang S	成熟胚	100	95	52(54.7%)
香 125S Xiang 125S	成熟胚	100	90	72(80.0%)

1) 括号中数据为胚性愈伤组织的继代成功率

2.3 转化植株的 T₀ 代鉴定

2.3.1 转化植株的早期鉴定

与农杆菌共培养后, 愈伤组织接入筛选培养基, 挑选明显增殖的生长状态良好的愈伤组织转移到预分化培养基上, 7 d 左右, 大部分愈伤组织出现绿点, 转移到分化培养基 10

d 左右, 有绿芽出现, 经生根壮苗, 3 个品种都获得大量的转化苗. 转化苗和对照植株叶片在潮霉素溶液中反应不同, 浸泡第 2 d 开始, 对照植株叶片在剪口两端开始变黄, 并在离剪口端 2 mm 的地方形成明显的分界线, 分界线区域叶片变黄, 中间部分保持绿色; 转化苗叶片保持整体的绿色, 看不到外观变化. 到第 4 或第 5 d, 对照植株叶片呈现水渍状, 出现一块一块变黄的区域, 而转化苗则在整个过程中始终保持整体绿色, 与在植株上颜色基本一致. 在第 7 d, 与转化苗相比, 对照叶片全部变黄, 看不到明显的绿色(图 2).

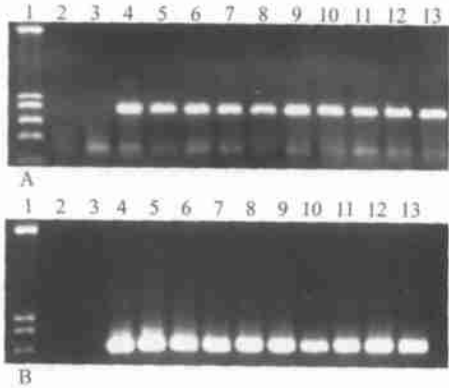


图 2 转化植株的潮霉素溶液抗性检测

Fig. 2 Hygromycin-resistance detecting of transgenic plants

2.3.2 PCR 分析

取几株 T₀ 代潮霉素溶液浸泡表现抗性的转基因植株抽提基因组 DNA, 分别扩增 *hpt* 基因和 *SacB* 基因(图 3). 由于 TAC 载体多克隆位点的左右两侧分别为植物筛选标记基因(*hpt* 基因)和蔗糖致死基因(*SacB* 基因), 而 T-DNA 转移是由右至左, 只要插入片段左右端进入植物基因组, 那么插入片段也应整合到植物基因组上. 以上结果说明 TAC 载体携带的外源片段完全整合到植物基因组上.



A: *hpt* 基因部分序列的扩增结果; B: *SacB* 基因部分序列的扩增结果

1: 分子量标记; 2: 水; 3: 未转化植株; 4: 阳性质粒; 5~13: 转化苗 DNA

A: examination of *hpt* gene; B: examination of *SacB* gene

1: marker; 2: water; 3: untransformed plant; 4: plasmid; 5~13: DNA of transgenic plants

图 3 香 125S 部分转化苗的 PCR 扩增检测

Fig. 3 PCR assay of Xiang 125S transgenic plants

图 3—A 显示 *hpt* 基因 PCR 扩增结果: 以所得到的阳性质粒为模板, 在预期的 753 bp 处有扩增带(第 4 泳道), 部分检测的转基因植株 DNA 在同样的位置也有扩增带(第 5~13 泳道), 而未转基因植株的阴性对照(第 3 泳道)没有相应的扩增带。

图 3—B 显示 *SacB* 基因 PCR 扩增结果: 以所得到的阳性质粒为模板, 在预期的 564 bp 处有扩增带(第 4 泳道), 部分检测的转基因植株 DNA 在同样的位置也有扩增带(第 5~13 泳道), 而未转基因植株的阴性对照(第 3 泳道)没有相应的扩增带。

3 讨论

安农 S-1 是目前两系杂交水稻中大面积应用的不育系来源之一, 来源于安农 S-1 不育基因的温敏核不育系香 125S、安湘 S、810S(安农 810S)等先后通过了专家技术鉴定, 并且香 125S×D68, 810S×怀 96-1(八两优 96)已通过了湖南、湖北、江西、浙江等省农作物品种审定委员会审定, 在生产上大面积推广^[1]。

安农 S-1 以及由其衍生的不育系在生产上具有重要作用, 但是其胚性愈伤组织的获得及其应用于转基因研究工作鲜见报道。在本研究中, 选用 3 个籼稻温敏核不育系水稻品种作为研究材料, 发现成熟胚盾片来源的愈伤组织诱导率均在 90%以上, 并且在 3 个品种中, 安农 S-1 的愈伤组织诱导率最高, 达 98%, 但是该品种也是最难形成胚性愈伤组织的品种, 且经过多次继代培养, 形成的愈伤组织状态也在 3 个品种中最差。香 125S 愈伤组织的诱导率在 3 个水稻品种中最低, 但是, 该品种的胚性愈伤组织比较容易形成, 在 3 个品种中最高, 并且形成的愈伤组织状态最好。作者在考察 3 个水稻品种的选育过程中发现, 香 125S 带有少许粳稻血缘, 这一结果也从侧面证明粳稻再生体系的建立要比籼稻容易, 与许多研究者的结果一致^[8, 12]。

TAC 载体系统容量大, 稳定性好, 易于操作, 相对于 BAC、PAC、YAC 而言, 最大的优点是可以直接用于转化植物细胞。据 Hamilton^[2] 和 Liu 等^[3] 的研究结果, 只要 T-DNA 的左右末端整合到植物基因组中, 则外源片段也应该完整地整合到植物的基因组中。在本研究中, TAC27 的右末端为潮霉素磷酸转移酶基因 *hpt*, 左末端为果聚糖蔗糖酶的基因 *SacB*, 对转基因水稻苗进行 PCR 检测, *hpt* 和 *SacB* 均能检测到阳性信号, 说明这 2 个基因已经整合到水稻基因组中, 也就是说, 它们中间的 50 kb 的外源片段也已经整合到水稻基因组中。TAC 载体自发明以来, 已经克隆了多个拟南芥^[3]、水稻^[6]、小麦^[7] 基因, 但是, 鲜见 TAC 载体介导的农杆菌转化籼稻的报道, 特别是一些应用价值大, 组织培养系统难以建立的品种。本研究的

开展, 将有助于温敏不育水稻基因的克隆, 对 TAC 载体更广泛的应用也将起到推动作用。

致谢: 本试验所使用的 TAC27 载体和广陆矮 4 号基因组文库由华南农业大学刘耀光研究员提供, 在此表示衷心感谢!

参考文献:

[1] 卢兴桂, 顾铭洪, 李成荃, 等. 两系杂交水稻理论与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 226—227, 238—239, 242—243, 255—256.

[2] HAMILTON C M. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA [J]. *Gene*, 1997, 200(1—2): 107—116.

[3] LIU Y G, SHIRANO Y, FUKAKI H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerate positional cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 6 535—6 540.

[4] SAWA S, WATANABE K, GOTO K, et al. *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domain [J]. *Genes Development*, 1999, 13(9): 1 079—1 088, 2 337.

[5] SATO S, KATO T, KAKEGAWA K, et al. Role of the putative membrane-bound endo-1, 4-β-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(3): 251—263.

[6] LIU Y G, LIU H, CHEN L, et al. Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning [J]. *Gene*, 2002, 282(1—2): 247—255.

[7] LIU Y G, NAGAKI K, FUJITA M, et al. Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome(TAC) vector [J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(5): 687—695.

[8] 周玲艳, 姜大刚, 吴 豪, 等. 几个光温敏不育水稻品种组织培养特性的研究 [J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(2): 45—47.

[9] LI L, QU R, KOCHKO A, et al. An improved rice transformation system using the biolistic method [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(3): 250—255.

[10] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 等. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 264—265.

[11] CLARK M S. 植物分子生物学——实验手册 [M]. 顾红雅 瞿礼嘉主译. 北京: 高等教育出版社, 1998. 6.

[12] 易自力, 曹守云, 王 力, 等. 提高农杆菌水稻转化频率的研究 [J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 352—358.

【责任编辑 李晓卉】