

文章编号: 1000-4025(2006) 06-1105-05

# 红树林耐盐相关基因转化水稻的研究\*

张文惠<sup>1,2</sup>, 林涛<sup>2</sup>, 张红心<sup>2</sup>, 陈亮<sup>2\*</sup>, 山仑<sup>1</sup>

(1西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100; 2厦门大学 生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建厦门 361005)

**摘要:** 运用农杆菌介导法将红树林耐盐相关基因 *mangrin* 转入粳稻品种‘日本晴’中, 通过 *GUS* 基因检测愈伤组织转化率, 确定农杆菌菌液浓度  $OD_{600}$  为 0.5, 浸染时间 30 min, 共培养时间 3 d 为最佳转化体系; 经潮霉菌筛选, 获得抗性再生植株。通过 PCR 扩增检测、Southern blot 分析和 *GUS* 基因活性检测, 结果表明, *mangrin* 基因整合到再生水稻的染色体 DNA 上。耐盐性测定结果表明, 转基因植株在 200 mmol/L NaCl 胁迫下, 成活率保持在 83.3%, 株高增长 20%~40%, *mangrin* 基因能提高转基因水稻对盐胁迫的抗性。

关键词: 红树林; 耐盐相关基因; 水稻; 转化

中图分类号: Q 785; Q 789 文献标识码: A

## Transformed Rice with Salt Tolerance-related Genes of *Bruguiera sexangula* by *Agrobacterium* Meditation

ZHANG Wen-hui<sup>1,2</sup>, LIN Tao<sup>2</sup>, ZHANG Hong-xin<sup>2</sup>, CHEN Liang<sup>2\*</sup>, SHAN Lun<sup>1</sup>

(1 College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Life Science Department and Key Laboratory of the Ministry of Education Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract** Salt tolerance-related genes in *Bruguiera sexangula* were transformed into *Oryza sativa* subsp. *japonica* cv. Nipponbare, a keng-rice variety. The optimal system of the transformation was found by detecting the callus-transformation rate with *GUS* gene to be the one with the agro-bacterium concentration set at  $OD_{600}$  0.5, the infection time set at 30 minutes and the culture time set at 3 days and then the regeneration plantlets were obtained by Hyg screening. *mangrin* gene was integrated in the DNA of the regeneration plantlets by PCR amplification, Southern blotting and *GUS* gene activity detection. The testing of the salt tolerance indicated that under the stress resulting from 200 mmol/L NaCl the transgenic plants maintained a survival rate of 83.3% and increased their heights by 20%~40% and thus *mangrin* gene could raise the resistance of the transformed rice to salt stress.

**Key words** *Bruguiera sexangula*; salt tolerance-related gene; rice; transformation

红树林植物是公认的耐盐、耐海水浸泡能力强的高等植物, 有些红树植物可在盐度高达 50‰~70‰的海水中生长<sup>[1]</sup>。Yamada 等<sup>[2]</sup>从红树林海莲 [*Bruguiera sexangula* (Lour.) Poir] 中克隆出耐盐

相关基因 *mangrin*, 将其导入大肠杆菌、酵母和烟草中, 转化子的耐盐性都得到了增强。该基因全长为 771 bp, 编码一个由 256 个氨基酸残基组成的蛋白质, 这个蛋白质为丙二烯氧化物环氧化酶 (allene

\* 收稿日期: 2006-02-18; 修改稿收到日期: 2006-05-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-444); 教育部重点项目 (01102)

作者简介: 张文惠 (1972-), 女 (汉族), 在读博士, 主要从事植物抗逆生理生化研究。E-mail: wenhui.zhang2003@163.com

\* 通讯联系人。Correspondence to: CHEN Liang. E-mail: chenl304@263.net

oxide cyclase, AOC)的同系物 *mangrin* 基因的耐盐特性可能与其蛋白中有一个从 16 位至 86 位的 70 个氨基酸功能区域有关。本研究从红树林海莲中提出耐盐相关基因 *mangrin*, 运用生物技术, 将其转入自然条件下不耐盐的水稻品种‘日本晴’ (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) 中, 检验转基因植物的耐盐性, 为研究 *mangrin* 基因的耐盐机理奠定基础, 同时为植物耐盐性机制机理研究和盐碱滩涂的开发利用提供依据

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

粳稻品种‘日本晴’幼胚由上海农业科学院张大庆研究员提供。

农杆菌株 EHA105 由厦门大学细胞生物学实验室保存。

pmangrin-1301 质粒由厦门大学细胞生物学实验室构建 (图 1)。

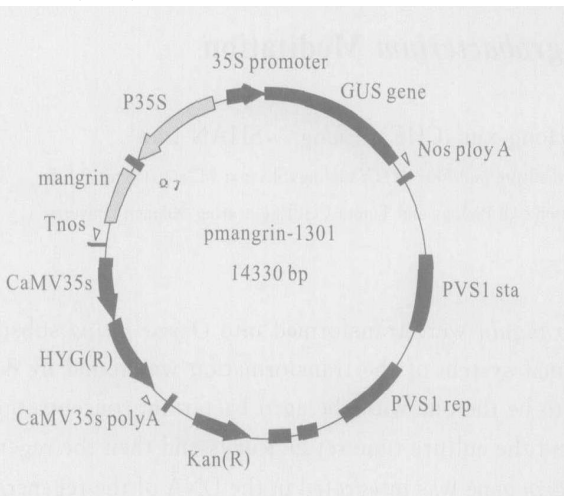


图 1 *mangrin* 基因结构

Fig. 1 The structure of *mangrin* gene

### 1.2 培养基类型

诱导培养基为 MS+ 2 mg/L 2, 4-D; 继代培养基 MB<sup>[3]</sup>+ 2 mg/L 2, 4-D; 共培养基培养基为 MS+ 4 mg/L 2, 4-D+ 100 $\mu$  mol/L AS; 筛选培养基为 NB<sup>[4]</sup>+ 2 mg/L 2, 4-D+ 500 mg/L Cb+ 100 mg/L Hyg; 预分化培养基为 NB+ 2 mg/L ABA+ 3 mg/L 6-BA+ 1 mg/L NAA+ 250 mg/L Cb+ 25 mg/L Hyg; 分化培养基为 NB+ 3 mg/L 6-BA+ 1 mg/L NAA+ 13 g/L Sorbitol+ 250 mg/L Cb+ 25 mg/L Hyg

### 1.3 方法

#### 1.3.1 水稻幼胚的组织培养

取水稻‘日本晴’幼

胚, 10% 的次氯酸钠表面消毒 45 min, 无菌水清洗 4~5 次, 每次 2~3 min; 用解剖针剥出幼胚盾片, 接种诱导培养基中, 长出愈伤组织后掐芽转移至继代培养基中, 25~26 $^{\circ}$ C 暗培养, 每 2 周继代 1 次

1.3.2 愈伤组织的浸染和遗传转化 挑取农杆菌单菌落接种到 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8~1.0, 转入新鲜的 LB 中培养, 分别取不同浓度的菌液 (OD<sub>600</sub> 为 0.3~0.7), 将愈伤组织块浸泡在其中 (加入乙酰丁香酮 AS 至终浓度为 100 $\mu$  mol/L), 对比不同浸泡时间, 优化条件。移出愈伤组织, 无菌滤纸吸干, 共培养 2~4 d 后转移至筛选培养基中, 30 d 后至预分化培养基, 每 2 周继代 1 次

1.3.3 *GUS* 基因表达检测 把共培养后的愈伤组织块及再生植株的叶片, 放入 X-Gluc 底物缓冲液中<sup>[5]</sup>, 37 $^{\circ}$ C 放置过夜, 用无水乙醇脱色, 呈蓝色的为 *GUS* 阳性

1.3.4 PCR 检测 提取转基因植株和未转化植株叶片 DNA<sup>[6]</sup>, 根据融合基因序列设计引物, 进行 PCR 扩增 5'端引物: 5'-AGC GGA TCC CTA GAA TGG CTC TTT CAA GCT CTG CT-3', 3'端引物: 5'-GGC GAA TTC ATT AAT CAC TAA TCG GTG AA-3'。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min

1.3.5 Southern 杂交 用地高辛标记的 *mangrin* 基因作为探针, 依照 Bio-Rad 公司的 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒操作, 标记转基因植株和未转化植物, 以 pmangrin-1301 质粒为阳性对照。

1.3.6 耐盐性检测 将 12 株转基因植物和 20 株对照植株, 分别于含 0 100 150 及 200 mmol/L NaCl 的溶液中培养, 20 d 后观察植株生长状况, 对植株成活率进行统计分析<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻愈伤组织培养和筛选

幼胚在诱导培养基上诱导 1 周后, 长出 1 cm 芽, 芽的基部出现颗粒状的愈伤组织, 掐芽后移至继代培养基; 2 周后, 愈伤组织长至直径 0.5~1.0 cm, 呈现淡黄色, 半松散颗粒状, 可用作遗传转化, 转化的愈伤在潮霉素筛选下先褐化变黑, 然后长出新的抗性愈伤 (图 2)。

### 2.2 转化与共培养条件的 *GUS* 基因检测

转化与共培养的 *GUS* 检测结果表明 (表 1), 农

杆菌浓度在  $OD_{600}$  为 0.5 时,浸染时间为 30 min,共培养时间为 3 d 时转化率最为理想。潮霉素 (Hyg 为 100 mg/L) 抗性筛选后的愈伤在预分化培养基 (Hyg 为 25 mg/L) 中长到直径为 5 mm 时,移至分化培养基 (Hyg 为 25 mg/L) 中分化成苗 (图 3)



图 2 筛选中的愈伤

1. 未转化愈伤; 2. 潮霉素抗性筛选的愈伤

Fig. 2 Calli on the medium containing antibiotic

1. The non-transformed callus; 2. The callus selected according to Hyg resistance

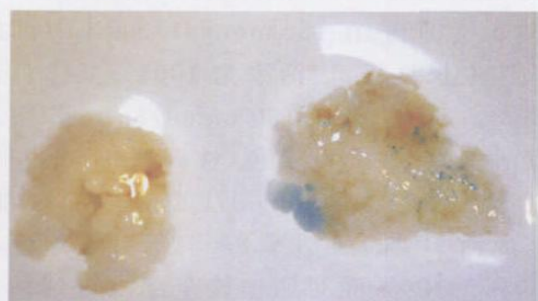
## 2.3 GUS 基因检测

转化的愈伤组织共培养后,经 GUS 基因组织化学染色,部分呈现蓝色,说明目的片段转入愈伤组织中 (图 4)。转基因植株叶片组织化学染色后,可见蓝色,说明 GUS 在植株中稳定表达 (图 5)。



图 3 转基因植株

Fig. 3 The transgenic plants



未转化愈伤GUS检测  
Non-transformed callus

转化愈伤GUS检测  
Transformed callus

图 4 GUS 基因在转化中瞬时表达

Fig. 4 The transient expression of GUS gene in the transformants

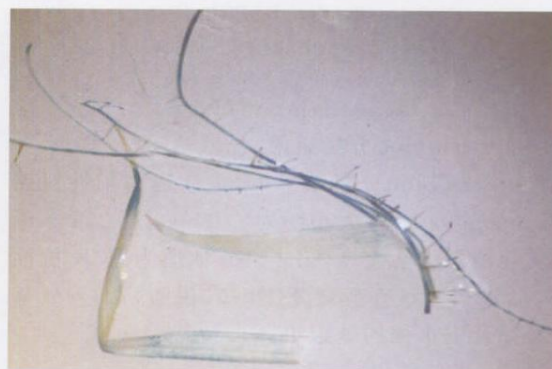


图 5 GUS 基因在抗性苗中稳定表达

Fig. 5 The stable expression of GUS gene in the resistant seedlings

表 1 不同转化条件下的 GUS 检测结果

Table 1 GUS gene transient expressions detected under different transformation condition

浸染时间 Infection time (min)	$OD_{600}$ 0.3			$OD_{600}$ 0.5			$OD_{600}$ 0.7		
	共培养天数 Co-culture time with <i>Agrobacterium</i> (d)								
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	+	+	+	+	+	+
30	-	+	+	++	+++	+++	++	++	++
40	-	+	+	++	++	++	+	++	+
50	-	-	+	-	+	+	-	+	+

注: - . 转化率 < 30%; + . 转化率 > 40%; ++ . 转化率 > 60%; +++ . 转化率 > 80%。

Note - means that rate of transformation (RT) surpassed 30%; + means that RT surpassed 40%; ++ means that RT surpassed 60%; +++ means that RT surpassed 80%

## 2.4 PCR检测

分别提取再生植株和未转化植株 DNA,以质粒 pmangin-1301为阳性对照,PCR扩增表明(图6),有60%以上再生植株为阳性,与阳性对照(大小约770 bp)条带一致而未转化植株没有相应条带(图6),说明 *mangrin* 基因已经整合进水稻的基因组。

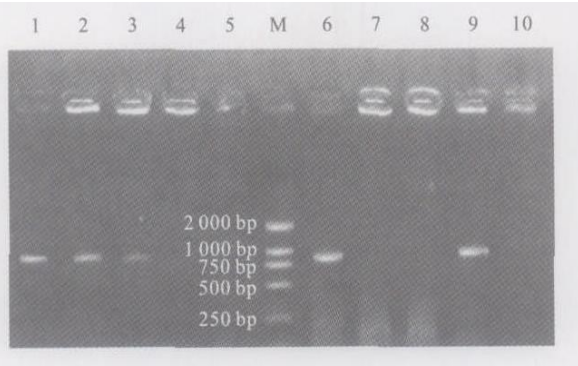


图6 转基因植株的PCR鉴定

1-6. 转基因植株; 7-8. 未转化植株;  
9. pmangrim-1301质粒; 10. 阴性对照; M. DL2000

Fig. 6 Identification of transgenic rice plantlets by PCR

1-6. Transgenic rice plantlets; 7-8. The non-transformed plantlets; 9. Positive control; 10. Negative control; M. DL2000

## 2.5 Southern blot分析结果

Southern blot分析结果,第1泳道为阳性对照(质粒 pmangin-1301大小约为770 bp),第2-3泳道为未转化植株无杂交斑,第4-10泳道为PCR抗性植株,有70%左右有杂交斑(图7),说明 *mangrin* 基因已经整合进水稻的基因组。

表2 转基因水稻及对照植株在不同盐溶液中生长20 d情况统计

Table 2 The characters of the transgenic rice plantlets and control rice plantlets growing in salt solution for 20 days

植株 Plantlet	0 mmol/L NaCl		100 mmol/L NaCl		150 mmol/L NaCl		200 mmol/L NaCl	
	成活率 Survival rate(%)	叶颜色 Leaf color	成活率 Survival rate(%)	叶颜色 Leaf color	成活率 Survival rate(%)	叶颜色 Leaf color	成活率 Survival rate(%)	叶颜色 Leaf color
转基因植株 Transgenic	100	鲜绿 Vindity	100	鲜绿 Vindity	100	绿 Green	91.6	黄绿 Kelly
对照植株 Control	100	鲜绿 Vindity	90	黄绿 Kelly	15	黄 Yellow	0	黄枯萎 Withering

## 3 讨论

(1) 农杆菌转化过程中,菌液浓度、浸染和共培养时间在转化系统中是重要的影响因素。如果菌液浓度过高,菌体本身相互聚结,影响其在外植体上的附着;浓度过低,不利于基因的转入。有文献报道<sup>[8]</sup>,在农杆菌介导的水稻遗传转化中,OD<sub>600</sub>值为0.6~

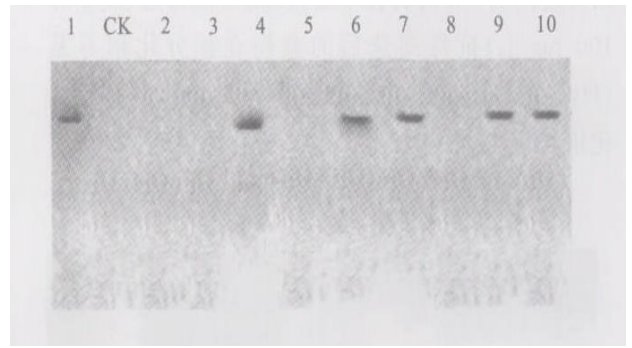


图7 转基因植株的Southern blot分析

1. pmangrn-1301质粒; CK. 阴性对照;  
2-3. 未转化植株; 4-10. 转基因植株

Fig. 7 Analysis of transgenic rice plantlets by Southern blotting

1. Positive control; CK. Negative control; 2-3. The non-transformed plantlets; 4-10. Transgenic rice plantlets

## 2.6 转基因植株耐盐性鉴定

在100 mmol/L NaCl水溶液中,12株转基因抗性植株生长很好,成活率为100%,叶鲜绿,株高增长30%~50%,与在无盐溶液中生长的对照植株生长情况类似;而对照植株在100 mmol/L NaCl溶液,虽然成活率为90%,但叶黄绿,株高增长10%~20%,生长受抑制。在150 mmol/L NaCl中,12株转基因植株生长良好,成活率为100%,叶绿色,株高增长30%~50%;而在150 mmol/L NaCl中,对照植株成活率为15%,叶黄色,株高增长5%左右,生长明显受抑制。在200 mmol/L NaCl中,12株转基因植株成活10株,成活率83.3%,叶黄绿色,株高增长20%~40%;而对照植株全部由黄到枯萎、死亡(表2)。

1.5效果较好,在本实验中发现随OD<sub>600</sub>值增大,瞬时GUS检测效果不太明显,而且当OD<sub>600</sub>值为0.7时,农杆菌已很难抑制。同时浸染的时间不宜过长,否则愈伤会受到伤害,不利于后期分化。

(2) 红树林耐盐相关基因 *mangrin* 作为丙二烯环氧化酶 AOC 的同源物,参与茉莉酸的代谢。许多报道认为<sup>[9-11]</sup>,茉莉酸在植物防御反应信号转导

中,既能独立介导防御反应,又能与其它抗逆诱导的信号相互作用,共同进行抗逆信号表达。丙二烯环氧化酶 AOC 是茉莉酸代谢途径的关键酶,在抗逆信号传导中起着重要的作用。

(3) 关于红树林植物耐盐相关基因克隆方面,研究和报道相对较少, Koichi (2000)<sup>[12]</sup>、Yamada (2002)<sup>[13]</sup>、周涵涛 (2004)等<sup>[14]</sup>将从红树林克隆的耐盐相关基因转入大肠杆菌、酵母和烟草中,能显著提

高转化子的耐盐性,但其耐盐机理仍然不很清楚。本实验首次用红树林耐盐相关基因 *mangrin* 转化水稻,抗性植株获得较高的耐盐性,这对于深入研究 *mangrin* 基因的耐盐机理,以及 *mangrin* 基因转入水稻中和其它基因所构成的生理代谢途径,有着重要的意义。同时耐盐水稻的获得,对筛选水稻耐盐品系及盐碱滩涂的开发利用提供了帮助。

## 参考文献:

- [1] 林 鹏. 中国红树林生态系 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 5- 24, 133- 147.
- [2] YAMADA A, SAITOH T, MIMURA T, *et al.* Expression of mangrove allene oxide cyclase salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast and tobacco cells [J]. *Plant Cell Physiol.*, 2002, **43** (8): 903- 910.
- [3] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiol. Plant.*, 1962, **15**: 473- 479.
- [4] CHU C C, WANG C C, SUN C S, *et al.* Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources [J]. *Scientia Sinica*, 1975, **18**: 659- 668.
- [5] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO J.*, 1987, **996** (13): 3 901- 3 907.
- [6] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1980, **8**: 8 321- 8 325.
- [7] ZHOU H T, LIN Q T, PAN W, *et al.* Introducing salt tolerance of mangrove into tobacco via breeding of salt tolerance transgenic tobacco [J]. *Chinese Science Bulletin (科学通报)*, 2004, **49** (2): 167- 172.
- [8] SHI L L, WANG S W, CAI B L. Study on effect of factors on genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in rice [J]. *Journal of Tianjin Agronomy (天津农学院学报)*, 2003, **10** (4): 53- 57.
- [9] JIAX T. Plant disease resistance signaling pathways [J]. *Chinese Bulletin of Botany (中国农学通报)*, 2003, **20** (5): 602- 608.
- [10] LIU X, ZHANG S Q, LOU C H. Jasmonic acid signal transduction and its relation to abscisic acid signal transduction [J]. *Plant Physiology Communications (植物生理学通讯)*, 2002, **38** (3): 285- 288.
- [11] ZHENG X C, ZHOU X, WU X Y. Advances in study of opening mechanism in rice florets [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, **37** (2): 188- 195.
- [12] KOICHI S, NOBUTAKA H, ZVY D, *et al.* Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein I increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza* [J]. *Plant Cell Physiology*, 2000, **41** (11): 1 279- 1 285.
- [13] MORIYA A, SAKAI F. Molecular cloning and sequence analysis for DELTA-pyrroline-5-carboxylate synthetases from mangrove plant [J]. *Wood Research*, 1998, **15** (8): 62- 65.
- [14] ZHOU H T, LIN P. Extraction of the salt-tolerance cDNA in mangrove *Avicennia marina* by mRNA differential display [J]. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2002 (18): 51- 54.