

# 植物抗病基因 *snc1* 在超级杂交稻父本 0293 中的遗传转化

成平<sup>1</sup>, 陈锦<sup>1</sup>, 袁定阳<sup>2</sup>, 罗孝和<sup>2</sup>, 夏石头<sup>1\*</sup>

(1.湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2.国交杂交水稻工程技术研究中心, 湖南 长沙 410125)

**摘 要:**以超级杂交稻父本 0293 为材料, 利用农杆菌介导基因转化法研究植物抗病基因 *snc1* 在超级杂交稻父本中的遗传转化。结果表明: 0293 成熟胚愈伤组织的最适诱导培养基为 NMB 诱导培养基, 2, 4-D 和 6-BA 的最适质量浓度分别为 3.0 和 0.2 mg/L; 以 LB 液体培养的农杆菌转化能力最强, 抽真空转化方式获得的抗性愈伤率较高, 最适共培养时间为 2 d; 麦芽糖为抗性愈伤组织分化的最适碳源, NMB+KT 0.4 mg/L+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L 为较适合的分化培养基; 通过优化农杆菌介导的遗传转化条件, 共获得 6 株含目的基因 *snc1* 的转化植株。

**关 键 词:** 超级杂交稻; *npr-1* 组成性抑制子 I; 愈伤组织; 农杆菌介导

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)03-0267-04

## Transferring of plant disease-resistance gene *snc1* into male parent of super hybrid rice 0293

CHENG Ping<sup>1</sup>, CHEN Jin<sup>1</sup>, YUAN Ding-Yong<sup>2</sup>, LUO Xiao-He<sup>2</sup>, XIA Shi-Tou<sup>1\*</sup>

(1.Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Changsha 410128, China; 2.China National Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, China)

**Abstract:** Male parent of super hybrid rice 0293 (0293) was used to study the genetic transformation of super hybrid rice by *Agrobacterium*-mediated transferring of plant resistant gene *snc1* (*suppressor of npr1-1, constitutive 1*) into rice plant. The results showed that the NMB medium is the optimal medium for callus induction on mature embryo of 0293, the optimal concentration of plant growth substances 2, 4-D and 6-BA are 3.0 mg/L and 0.2 mg/L, respectively; the transferring capability of *Agrobacterium* in LB liquid medium is found to be the best, and higher rate of resistant callus is obtained by the vacuum transferring under 2 days of co-cultivation; maltose is the optimal carbon source for resistant callus differentiation, and the best differentiation medium is NMB containing 0.4 mg/L KT, 2.5 mg/L 6-BA, 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L IAA. After optimized the conditions of *Agrobacterium*-mediated transferring, 6 transformants with the target *snc1* gene was obtained in this paper.

**Key words:** super hybrid rice; *snc1*; callus; *Agrobacterium*-mediated

拟南芥 *SNC1* 基因是一种重要的水杨酸诱导型广谱抗病基因<sup>[1-2]</sup>, 其突变体 *snc1* 基因可组成性表达病程相关蛋白, 增强植株的抗病虫害能力, 尤其是对细菌病原体 (*Pseudomonas syringae* pv *maculicola* ES4326 (*P.s.m.* ES4326)) 和卵菌病原体 (*Hyaloper-*

*onospora arabidopsidis* NOCO2 (*H.a.Noco2*)) 有较强抗性<sup>[3]</sup>。笔者以超级杂交稻父本 0293 为材料, 通过筛选愈伤组织诱导培养基、确定植物生长物质浓度、选择农杆菌培养方式和农杆菌浸染方式等, 将 *snc1* 基因导入 0293 成熟胚诱导的愈伤组织中, 筛选

收稿日期: 2011-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970247); 湖南省杰出青年基金项目(11JJ1007); 湖南省高校科学研究重点项目(09A037)

作者简介: 成平(1986—), 女, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 主要从事水稻遗传转化研究, 591761913@qq.com; \*通信作者, xstone0505@hunau.net

分化后以期得到高抗病型的杂交稻亲本,从而获得新的杂交水稻抗性种质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

超级杂交稻父本0293,由湖南杂交水稻研究中心罗孝和提供;遗传载体为湖南省植物激素与生长发育重点实验室改造的pG229质粒,含有Kan<sup>+</sup>与Basta双重抗性标记;Atsnc1由加拿大英属哥伦比亚大学Michael Smith 实验室提供。愈伤组织的诱导、继代、筛选、分化和生根的基本培养基参照文献[4]配制。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 0293 成熟胚愈伤组织的诱导和分化

1) 培养基对 0293 愈伤组织诱导的影响。采取完全随机设计,将成熟胚分别接种于 MB、N6、NB、NMB 4 种培养基<sup>[5-8]</sup>,进行愈伤组织诱导,其中 2,4-D 质量浓度为 3.0 mg/L,6-BA 质量浓度为 0.2 mg/L,添加酸水解酪蛋白和脯氨酸。7 d 后,分别统计 4 种培养基对 0293 诱导的芽长、愈伤组织质量和诱导率。

2) 植物生长物质对 0293 愈伤组织诱导的影响。采取单因素试验设计,2,4-D 质量浓度分别为 2.0、2.5、3.0 mg/L<sup>[9]</sup>,6-BA 质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mg/L<sup>[10]</sup>,统计各处理的芽长、愈伤组织质量和愈伤组织诱导率。

3) 分化培养基对愈伤组织分化的影响。以 DL 或 NMB 为基本培养基,麦芽糖或蔗糖为碳源,搭配 KT 0.000 4 g/L、6-BA 0.002 5 g/L、NAA 0.000 5 g/L、IAA 0.000 5 g/L 诱导愈伤组织分化<sup>[11]</sup>,观察愈伤组织的分化情况。

#### 1.2.2 snc1 基因转化愈伤组织

1) 农杆菌培养方式。采取 4 种方式进行农杆菌培养<sup>[12]</sup>:①YEB 液体培养;②YEB 固体培养;③LB 液体培养;④LB 固体培养。液体培养后,离心收集菌体再配制浸染液;固体培养后直接用平板上的菌落配制浸染液,分别用浸染液转化同一批愈伤组织,统计筛选后抗性愈伤的获得率。

2) 农杆菌浸染方式。采取 2 种浸染方式进行转化<sup>[13-14]</sup>:①振荡 20 min 后静止 10 min;②振荡 15 min 后抽真空 15 min,再手动振荡 5 min,分别统计筛选后的抗性愈伤率。

3) 共培养时间。设置 1、2、3 d 进行共培养<sup>[15]</sup>,观察共培养阶段愈伤组织的生长情况,并分别统计筛选后的抗性愈伤率。

### 1.3 转化植株的检测

采用试剂盒(天根生化科技有限公司)提取转化植株的 DNA,用 snc1 特异引物进行 PCR 检测,所得片段大小约为 1 300 kb。正向引物为:GTGGAGT TCCCATCTGAACATC;反向引物为:CCCATT TGGATTGCTGGAAAG。PCR 反应体系(25 μL):10× Buffer 2.5 μL,dNTP 0.5 μL,正反向引物各 0.6 μL,模板 1.0 μL,Taq 酶 0.4 μL,ddH<sub>2</sub>O 19.4 μL。反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 15 s;55℃退火 30 s;68℃延伸 1 min;循环 40 次;68℃延伸 5 min。PCR 产物用 1%的琼脂粉凝胶检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基对 0293 成熟胚愈伤组织诱导的影响

0293 在 MB 培养基诱导的芽长分别比在 N6、NMB、NB 培养基上的芽长高 38.24%、47.84%和 52.86%,差异显著(图 1)。NMB 培养基上诱导的愈伤组织颜色淡黄,颗粒圆润饱满,且生长最迅速,愈伤组织质量最大;N6 和 NB 培养基上诱导的愈伤组织颜色淡黄,颗粒较饱满,生长较迅速;MB 培养基上诱导的愈伤组织颗粒小且褐化现象较严重。

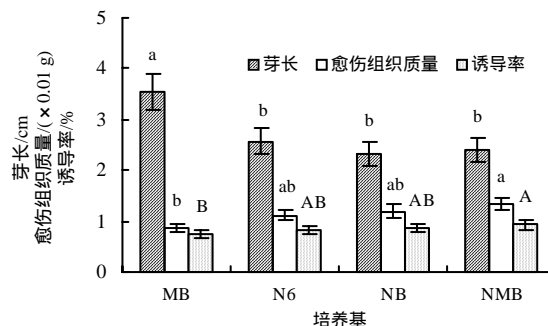


图 1 0293 愈伤组织在不同培养基上诱导的芽长、愈伤组织质量和诱导率

Fig.1 The length of shoot, weight of calli and inducing rate of 0293 calli on different cultural media

在 NMB 培养基上诱导的愈伤组织质量为 0.013 g，比 NB、N6、MB 上的分别高 11.67%、19.64%和 54.02%。NMB 培养基上的诱导率最高(92.6%)，与其他 3 种培养基的诱导率差异极显著，因此，以 NMB 培养基较适合 0293 愈伤组织的诱导。

2.2 植物生长物质对 0293 成熟胚愈伤组织诱导的影响

从表 1 中可以看出，当 2, 4-D 质量浓度为 3.0 mg/L 时，愈伤组织诱导率最高，达 94.5%，极显著高于 2.0 mg/L 和 2.5 mg/L 处理的愈伤组织诱导率；3.0 mg/L 处理的芽长显著短于 2.0 mg/L 处理的芽长，但 3 种 2, 4-D 浓度的处理对愈伤组织质量的影响没有显著差异，表明 2, 4-D 质量浓度对 0293 愈伤组织的诱导率影响极显著，对芽长的影响显著，对愈伤组织质量的影响不显著。而 6-BA 质量浓度对芽长的影响显著，对愈伤组织质量和诱导率无显著影响，但能显著提高后期愈伤组织的分化能力。

表 1 2, 4-D 和 6-BA 对 0293 愈伤组织诱导的影响  
Table 1 Effects of 2, 4-D and 6-BA on callus induction of 0293

植物生长物质	质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	芽长/ cm	愈伤组织 质量/g	诱导率/%
2,4-D	2.0	3.08 a	0.010	65.0 A
	2.5	2.80 ab	0.011	82.8 B
	3.0	2.31 b	0.013	94.5 B
6-BA	0.1	2.58 ab	0.010	92.9
	0.2	2.44 b	0.013	93.6
	0.3	3.11 a	0.012	92.6

2.3 分化培养基对愈伤组织分化的影响

DL 和 NMB 培养基对抗性愈伤组织的分化效果差异不显著，分化 20 d 左右都会出芽，也都有一定比例的褐化，但是 NMB 培养基的出苗率比 DL 培养基的稍高。

用麦芽糖作碳源时，分化约 7 d 就可见新的愈伤组织，大小均匀，结构紧致，分化 10~15 d 会有绿芽出现，而以蔗糖作碳源时，愈伤组织生长缓慢，2 周左右才会长出新的愈伤组织，且结构松散，一夹即碎，分化 15~20 d 才会有绿点出现，但是很难出芽。

2.4 浸染方式对转化效果的影响

由图 2 可知，液体培养方式的抗性愈伤率高于

固体培养方式，而 LB 液体培养的抗性愈伤率又稍高于 YEB 液体培养。LB 液体培养的抗性愈伤率为 31.43%，比 YEB 液体培养、LB 固体培养、YEB 固体培养分别高出 30.03%、50.70%、84.34%，且与 YEB 固体培养方式的差异极显著。

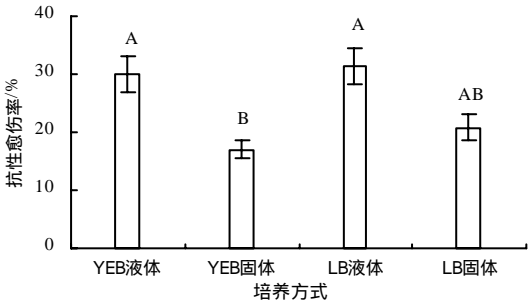


图 2 农杆菌培养方式对抗性愈伤率的影响

Fig.2 Effects of cultural method of *Agrobacterium*

抽真空浸染方式获得的抗性愈伤率为 23.21%，比不抽真空的浸染方式获得的抗性愈伤率高 78.54%，两处理间的差异极显著。这表明浸染过程中进行抽真空处理，能显著提高转化效率。

2.5 共培养时间对转化效果的影响

浸染后的愈伤组织干燥 4 h 后转移至铺有一层滤纸的共培养基上<sup>[16]</sup>，分别培养 1、2、3 d，结果显示，共培养 1 d 时，抗性愈伤率仅为 6.19%，可能是共培养时间短，带有目的基因的农杆菌尚未转染入愈伤组织；共培养 2 d 时，抗性愈伤率高达 45.16%，是较适宜的共培养时间，而共培养 3 d 时，抗性愈伤率为 9.40%，可能是培养时间过长，农杆菌生长旺盛，后期很难抑制。

2.6 转化植株的 PCR 检测

待分化培养基中绿芽长于 2 cm 后，将它从愈伤组织上剥离，转入生根培养基中。大约 2 周后，幼苗长出完整的根系，加水炼苗 2~3 d，将其移出，洗净根上的培养基，剪掉变黄的叶片，移栽到稻田土中。取移栽到稻田土中 T<sub>0</sub> 代转化植株叶片，用试剂盒法提取小量 DNA，用 *snc1* 基因的特异引物进行 PCR 扩增检查。

由图 3 可知，10 株 0293 再生植株中有 6 株含有 *snc1* 目的基因，分别为 T<sub>0</sub>-2、T<sub>0</sub>-4、T<sub>0</sub>-8、T<sub>0</sub>-9、T<sub>0</sub>-11 和 T<sub>0</sub>-15，表明该 6 株水稻植株是带有目的基因的转化子植株。因为 *Atsnc1* 基因是一种获得功能

型突变基因,可以组成性表达致病机理相关(*PR*)基因,从而激活抗病性反应,0293  $T_0$  代转化植株中的 *snc1* 基因是否有同样地生理功能,以及 *snc1* 基因在转化植株中的插入位置等,还有待后续试验进一步研究。

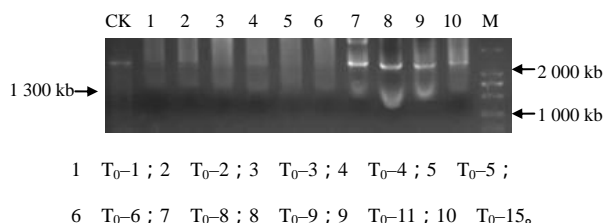


图3 0293  $T_0$  代转化植株 *snc1* 基因 PCR 检测结果

Fig.3 PCR check of *snc1* gene in transformants of 0293  $T_0$

#### 参考文献:

- [1] Zhang Y L, Goritschnig S, Dong X N, et al. A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in *suppressor of npr1-1* constitutive I[J]. The Plant Cell, 2003, 15(11): 2636-2646.
- [2] Zhu Z H, Xu F, Zhang Y X, et al. *Arabidopsis* resistance protein SNC1 activates immune responses through association with a transcriptional corepressor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(31): 13960-13965.
- [3] 朱兆海. 拟南芥 *snc1* 相关突变体调控基因的确定及抗病功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学生物科学技术学院, 2007.
- [4] 赵世杰, 史国安, 董新纯. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 154.
- [5] 马菊兰, 张博. 培养基、蔗糖和激素对苜蓿花药愈伤组织诱导的影响[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(6): 839-844.
- [6] Lin Y J, Zhang Q F. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Reports, 2005, 23(8): 540-547.
- [7] Yan L N, Li X, Wu D. The comparison in tissue culture ability of mature embryo in different cultivars of rice[J]. Agricultural Sciences in China, 2010 (6): 840-846.
- [8] 康海岐, 申国安. 水稻愈伤组织对不同培养基的适应性、潮霉素的敏感性及其在遗传转化中的利用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 50-54.
- [9] 孙建昌, 马静, 杨生龙, 等. 宁夏水稻成熟胚离体再生体系的建立[J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 80-84.
- [10] 苗春波, 万志刚, 孙丙耀. 2, 4-D和6-BA对籼稻成熟胚愈伤组织诱导和植株再生的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 12927-12929.
- [11] 陈兴春, 牛蓓, 王克秀, 等. 水稻愈伤组织分化与不同激素配比关系的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2006, 43(1): 222-227.
- [12] 柳红. 籼稻高效遗传转化体系的建立[D]. 福州: 福建农林大学作物科学学院, 2009.
- [13] 邱金梅, 温世杰, 刘海燕, 等. 根癌农杆菌介导花生高效遗传转化体系的优化[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(2): 208-211.
- [14] 雷江丽, 王丹, 吴燕民, 等. 农杆菌浸种法介导中华结缕草遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2009(5): 865-871.
- [15] Wang W X, Zhang J C, Liu X Q. The factors of genetic transformation for indica rice kasalath[J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(6): 29-32.
- [16] 周杰, 王春台, 刘学群, 等. 提高农杆菌介导的籼稻成熟胚愈伤组织再生频率研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(33): 1-5.

责任编辑: 罗慧敏