

利用共转化和花药培养技术快速获得无选择标记的三价转基因水稻

朱 丽^{1, #} 傅亚萍^{1, #} 刘文真¹ 胡国成¹ 斯华敏¹ 唐克轩² 孙宗修^{1, *}

(¹ 中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006 ; ² 上海交通大学 农业与生物学院 植物生物技术研究中心, 上海 200030 ;
共同第一作者 ; * 通讯联系人, E-mail : sunzx405@tom.com)

Rapidly Obtaining the Marker Free Transgenic Rice with Three Target Genes by Co Transformation and Anther Culture

ZHU Li^{1, #} , FU Ya ping^{1, #} , LIU Wen zhen¹ , HU Guo cheng¹ , SI Hua min¹ , TANG Ke xuan² , SUN Zong xiu^{1, *}

(¹ State Key Laboratory of Rice Biology , China National Rice Research Institute , Hangzhou 310006 , China ; ² Plant Biotechnology Research Center , School of Agriculture and Biology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200030 , China ; # These authors contributed equally to this paper ; * Corresponding author , E-mail : sunzx405@tom.com)

Abstract : The “double T- DNA” binary vector p13HSR which carried two independent T- DNAs , containing hygromycin phosphotransferase gene (hpt) in one T- DNA region and three target genes (hLF , SB401 , RZ10) in the other T- DNA region , was used to generate selectable marker free transgenic rice by *Agrobacterium* mediated transformation . T₀ plants with the three target genes and *hpt* gene were selected for anther culture . It took only one year to obtain double haploid selectable marker free transgenic plants containing the three target genes through co transformation followed by anther culture , with an efficiency of 9.87% . RT- PCR analysis indicated that the target genes were inserted into rice genomic DNA and successfully transcribed . It was noted that one or two target genes derived from the binary vector were lost in some transgenic rice plants .

Key words : anther culture ; co transformation ; selectable marker free ; transgenic rice ; double T- DNAs

摘 要 : 采用农杆菌介导的水稻转化体系 , 将包含选择标记潮霉素磷酸转移酶基因 (hpt) 和目的基因人乳铁蛋白 (hLF) 、高赖氨酸 (SB401) 、高甲硫氨酸 (RZ10) 基因的双 T- DNA 表达载体 p13HSR 转化水稻。筛选潮霉素磷酸转移酶基因和目的基因都是阳性的转基因植株 , 按单株进行花药培养 , 快速得到无选择标记而目的基因阳性的转基因纯合植株 , 得率为 9.87% 。 RT- PCR 检测结果显示外源基因已整合到转基因水稻基因组中并转录。同时观测到三价表达载体在转化过程中部分目的基因丢失。

关键词 : 花药培养 ; 共转化 ; 无选择标记 ; 转基因水稻 ; 双 T- DNA 结构

中图分类号 : Q943.1 ; S511.035.3

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2007)05-0475-07

在植物转基因过程中 , 为了有效地识别和筛选转化子 , 常将目的基因和标记基因构建在同一表达载体中。这种载体结构导致转基因植物中目的基因和标记基因始终共存 , 而标记基因 (尤其是抗生素抗性基因) 的存在可能给转基因植物的生物安全带来隐患。目前已研发了多种方法剔除转基因植物中的标记基因 , 其中最常见的是共转化法^[1-2]。共转化系统是采用 2 个质粒或 1 个含有两套 T- DNA 表达盒的表达载体共同转化植物 , 其中一套表达盒含有抗性选择标记基因 , 另一套表达盒含有目的基因 , 它们在转化植物时可能整合到植物基因组的不同位置。转基因植株在减数分裂过程中 , 标记基因和目的基因发生分离 , 从而可在转基因后代中筛选到只含目的基因而不含选择标记基因的个体。共转化从根本上排除了转基因植物中的选择标记 , 是保证人畜和环境安全的重要措施 , 因而受到了广泛的重视。

Zhou 等^[3]认为 , 用分别含 1 个 T- DNA 区的两个载体共转化的效率低于双 T- DNA 区表达载体的共转化效率。目前关于利用双 T- DNA 区表达载体 , 获得无选择标记转基因阳性株系的研究已有不少报道^[4-6]。花药培养与遗传转化技术相结合 , 可以快速获得纯合转基因植株^[7-8] , 但是应用双 T- DNA 载体转化水稻结合花药培养技术快速获得只含目的基因而无选择标记的转基因研究尚未见报道。

水稻是最主要的粮食作物 , 转基因水稻的安全显得尤为重要。水稻生物学国家重点实验室采用农

收稿日期 : 2007-03-15 ; 修改稿收到日期 : 2007-04-23。

基金项目 : 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 (FY03-B-07) 国家 973 计划资助项目 (G19990116-1-2005CB120801)。

第一作者简介 : 朱 丽 (1978 -) , 女 , 博士研究生 , E-mail : luryun78@163.com ; 傅亚萍 (1960 -) , 女 , 副研究员 , E-mail : cnrrifuy@hotmai.com。

杆菌介导的水稻转化体系,将包含人乳铁蛋白(hLF)、高赖氨酸(SB401)、高甲硫氨酸(RZ10)基因的表达载体 p13HSR 成功转化脆茎稻。由于该表达载体采用双 T DNA 结构,将检测出同时含选择标记潮霉素磷酸转移酶基因(hpt)和目的基因的转基因阳性 T₀ 植株按单株直接进行花药培养。在 189 株二倍体花培植株中检出 23 株有目的基因没有选择标记 *hpt* 的转基因纯合植株,得率为 9.87%。RT-PCR 检测结果显示外源基因已整合到转基因水稻基因组中并转录。还对农杆菌介导的同一载体上多个基因转化水稻后,会出现个别基因丢失的情况进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料及试剂

实验所用粳稻 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) 品系脆茎稻(brittle culm)由水稻生物学国家重点实验室钱前博士提供。常用试剂为国产分析纯,RNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,RNase free 的 DNase 购自 Promega 公司,PCR、RT-PCR 所用酶及试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。PCR 引物由北京奥科公司合成。

1.1.2 质粒和根癌农杆菌

表达载体 p13HSR 由上海交通大学农业与生物学院提供,农杆菌菌株为 EHA105。p13HSR 含两个独立的 T DNA 区,其中一个有潮霉素磷酸转移酶基因(hpt),另一个包含由玉米醇溶蛋白 19Z 启动子启动的人乳铁蛋白基因(hLF)、由水稻谷蛋

白(GluB 1)启动子启动的高赖氨酸蛋白基因(SB401)和高甲硫氨酸蛋白基因(RZ10),SB401 和 RZ10 共用启动子和终止子(图 1)。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌转化水稻

基因转化参照 Hiei 等^[9]的方法并加以修改。取开花后 12~15 d 的稻穗脱粒,表面灭菌后接种在 NB 培养基上,26℃ 下暗培养诱导愈伤组织。约 5~7 d 后取愈伤组织在相同条件下继代培养,用于共培养。农杆菌于含 50 mg/L 卡那霉素(Kan)的 YM 平板上划线,28℃ 下暗培养 3 d,用金属匙收集农杆菌菌体,悬浮于共培养 CM 液体培养基中,调整菌体浓度至 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5,加入乙酰丁香酮(AS,终浓度为 100 mmol/L),即为共培养转化水稻用的农杆菌悬浮液。将继代培养 4 d 后的愈伤组织浸于此菌液中,20 min 后取出并用无菌滤纸吸去多余菌液,随即转入铺有无菌滤纸的固体培养基上,于 26℃ 下暗培养 2~3 d。共培养后的愈伤组织在含 50 mg/L 潮霉素的筛选培养基上,26℃ 下暗培养 14 d,再转到新鲜配制的筛选培养基上继续筛选 14 d。然后选择生长旺盛的抗性愈伤组织转移到含有 50 mg/L 潮霉素的分化培养基上,暗培养 3 d 后转至 15 h/d 光照条件下培养,再生的小苗在 1/2MS 上生根壮苗两周左右。选择高约 10 cm、根系发达的小苗,按编号移栽入土。

1.2.2 T₀ 代转基因阳性株的花药培养

转基因植株按单株进行花药培养,花药培养采用本实验室建立的一步成苗法^[3,10]。试管苗(DHT₀)成活后按外植体来源逐株编号,常规管理。

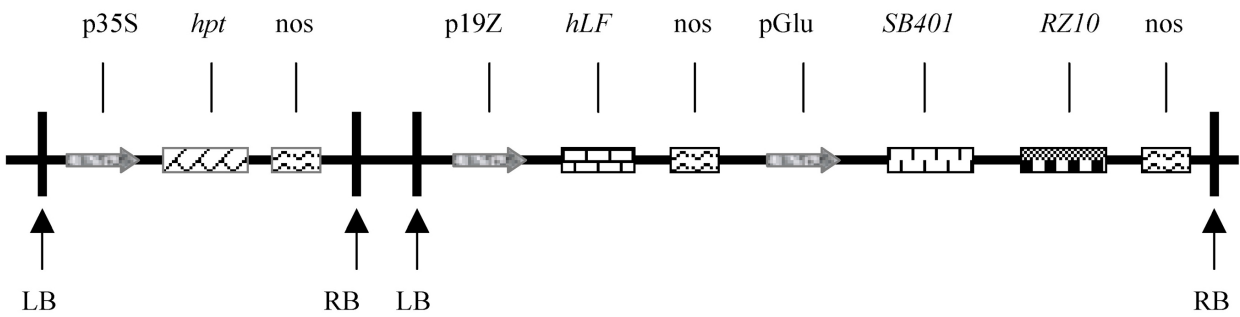


图 1 含双 T-DNA 区载体 p13HSR 的图谱

Fig.1 . Schematic diagram of the “double T- DNAs” vector p13HSR .

p35S - 花椰菜花叶病毒 35S 启动子 ;p19Z - 玉米醇溶蛋白 19Z 启动子 ;pGlu - 水稻谷蛋白(GluB 1)启动子 ;hLF - 人乳铁蛋白基因 ;SB401 - 高赖氨酸蛋白基因 ;RZ10 - 高甲硫氨酸蛋白基因 ;nos - 农杆菌胭脂碱合成酶基因终止子 ;hpt- 潮霉素磷酸转移酶基因 ;LB 和 RB 分别表示 T DNA 区的左右边界序列。

p35S , CaMV35S promoter ;p19Z , Corn prolamine 19Z promoter ;pGlu , Rice glutelin(GluB 1) promoter ;hLF , Human Lactoferrin gene ;SB401 , Lysine rich protein gene from potato ;RZ10 , Methionine rich protein gene from rice ;nos ,Terminator region of *Agrobacterium nopaline* synthase gene ;hpt , Hygromycin phosphotransferase gene ;RB and LB , Right and left borders of T DNA region ,respectively .

1.2.3 转基因(T₀)与花培转基因植株(DHT₀)的PCR检测

按照卢扬江等^[11]报道的方法提取转基因水稻的DNA。以叶片总DNA为模板分别扩增人乳铁蛋白(hLF)、高赖氨酸(SB401)、高甲硫氨酸(RZ10)基因以及选择标记基因(hpt),同时扩增水稻内参SPS基因验证模板有效性,所用引物见表1。15 μL反应体系中包括20 mmol/L Tris HCl,10 mmol/L (NH₄)₂SO₄,10 mmol/L KCl,2 mmol/L MgCl₂,1% Triton X-100,pH 8.8,0.6 U Taq酶,0.17 mmol/L dNTPs,0.33 μmol/L引物,100 ng模板DNA。ABI 9600 PCR仪上进行PCR扩增,反应条件为:94℃下预变性4 min,94℃下30 s,退火(退火温度随引物各异)30 s,72℃下1 min,30个循环;最后在72℃下延伸10 min。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下观察拍照。

1.2.4 RT-PCR检测

取花培转基因植株(DHT₀代)新鲜叶片200 mg于液氮中研磨提取RNA,具体操作参见上海生工生物工程有限公司RNA提取试剂盒操作说明。所得RNA样品用RNase free DNase于37℃下消化30 min,消化体系包括:40 mmol/L Tris HCl (pH 8.0),10 mmol/L MgSO₄,1 mmol/L CaCl₂,1 U RQ1 RNase Free DNase,300 ng模板总RNA。然后加1 μL RQ1 DNase Stop Solution(20 mmol/L EGTA,pH 8.0)于65℃下10 min终止反应。RQ1 RNase Free DNase消化后的RNA样品进行反转录反应,反应体系包括:5 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L Tris HCl (pH 8.3),50 mmol/L KCl,1 mmol/L dNTPs,10 U RNase Inhibitor,2.5 U

AMV反转录酶,2.5 pmol/μL Random 9 mers,120 ng总RNA模板。按如下条件反应:30℃下10 min;42℃下30 min;99℃下5 min;5℃下5 min。反转录产物进行PCR扩增,50 μL反应体系包括:5×PCR buffer 10 μL (TaKaRa),5 U TaKaRa ExTaqTM HS,0.33 μmol/L Primer,反转录cDNA第一链反应产物5 μL(约60 ng)。ABI 9600 PCR仪上进行PCR扩增,反应条件为:94℃下预变性4 min,94℃下30 s,退火(退火温度随引物各异)30 s,72℃下1 min,40个循环;最后在72℃下延伸10 min。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶中电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 农杆菌转化获得T₀代转基因植株

将双T-DNA载体p13HSR转化脆茎稻,共获得96株转基因苗(T₀代)。PCR检测表明其中41株既含潮霉素抗性基因又含目的基因(S⁺G⁺),42株只有潮霉素抗性基因没有目的基因(S⁺G⁻),4株有目的基因没有潮霉素抗性基因(S⁻G⁺),9株目的基因和潮霉素抗性基因都没有(S⁻G⁻)。双T-DNA区表达载体p13HSR在水稻中的共转化频率为42.7%。没有选择标记的13株(13.5%)T₀代转基因苗,是逃过抗生素的抑制幸存下来的,从技术上和理论上都无法控制其出现频率。所以挑选了目的基因和选择标记都有的T₀代植株进行后续的花培纯合实验。

2.2 花药培养获得剔除选择标记的转基因阳性纯系

从先期获得的41株既含潮霉素抗性基因又含目的基因的T₀代植株中,选5株按单株进行花药

表1 转基因水稻PCR检测所用引物
Table 1 . PCR primers for analyzing transgenic rice lines .

基因 Target gene	引物序列 Sequence of primer	产物 Product/bp	退火温度 T _m /
人乳铁蛋白基因 <i>hLF</i>	hLFp1(5'-TATCTTACTGTGGCGGTGGTTAGGA-3') hLFp2(5'-CTGTTTCAGGCGTTCCACCTTATCG-3')	530	56
高赖氨酸蛋白基因 <i>SB401</i>	SB401p1(5'-AACGCCACGATTCTTAAGAACAAGA-3') SB401p2(5'-TAGCATCTGTGGCCTCAGAAATAGG-3')	520	56
高甲硫氨酸蛋白基因 <i>RZ10</i>	RZ10p1(5'-AACGCCACGATTCTTAAGAACAAGA-3') RZ10p2(5'-TGCCCGAGTCCAGCACAAATAAG-3')	950	55
潮霉素磷酸转移酶基因 <i>hpt</i>	HPTp1(5'-GTTTATCGGCACTTTGCATCG-3') HPTp2(5'-GGAGCATATACGCCCGGAGT-3')	560	58
蔗糖磷酸合成酶基因 <i>SPS</i>	SPSp1(5'-TTGCGCCTGAACGGATAT-3') SPSp2(5'-GGAGAAGCACTGGACGAGG-3')	277	55

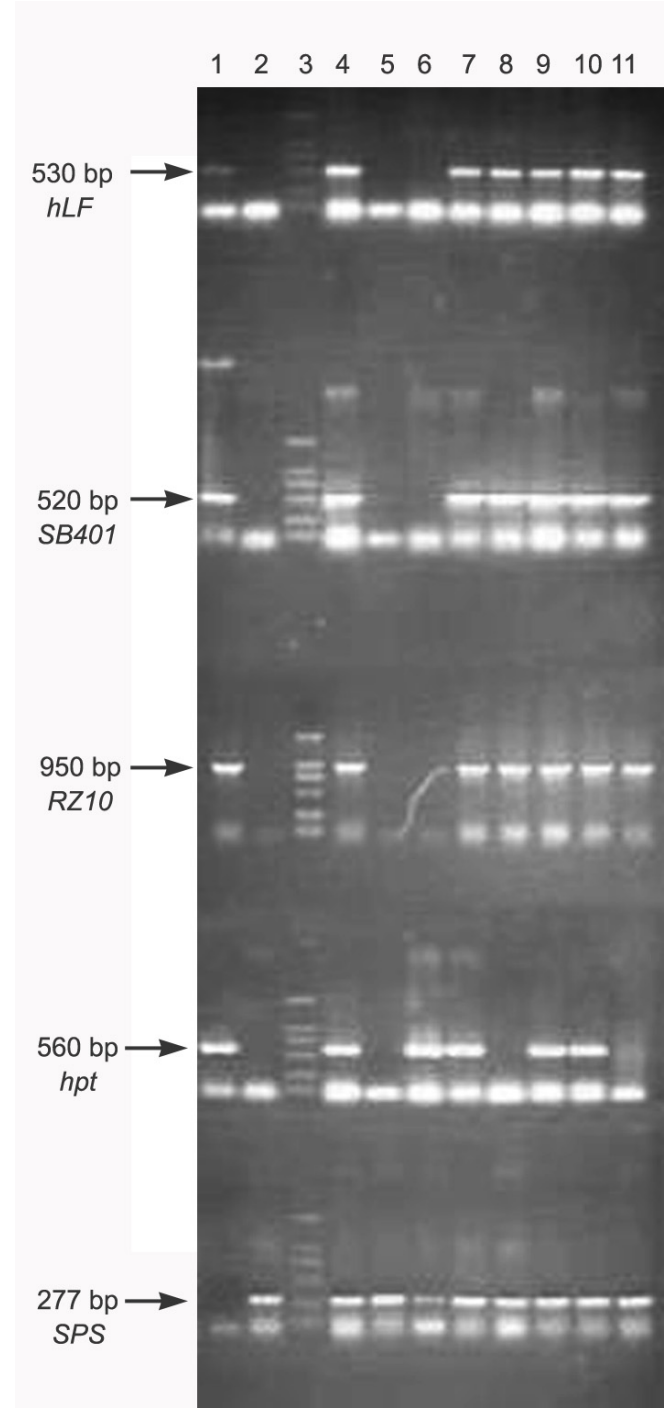


图 2 花培转基因水稻植株中目的基因的 PCR 检测
Fig 2 . PCR analysis of dihaploid plants .

1 - 载体 p13HSR(阳性对照) ; 2 - 野生型水稻(阴性对照) ; 3 - DL2000(TaKaRa) ; 4~ 11 - 转基因水稻单株。
1 , Vector p13HSR CK⁺ ; 2 , CK⁻ (Oryza sativa L . subsp . *japonica* , brittle culm) ; 3 , DL2000 (TaKaRa) ; 4 to 11 , Transgenic rice lines .

培养 5 个 DHT₀ 代群体共获得花培苗 233 株 ,其中 189 株二倍体 ,7 株四倍体 ,37 株单倍体。二倍体植株的 PCR 检测结果表明 ,有 68 株既含潮霉素又含目的基因(S⁺ G⁺) ,24 株只有潮霉素没有目的基因(S⁺ G⁻) ,74 株目的基因和潮霉素都没有(S⁻ G⁻) ,23 株有目的基因没有潮霉素(S⁻ G⁺)。而且 5 个株系中都有 S⁺ G⁺ ,S⁺ G⁻ ,S⁻ G⁺ 和 S⁻ G⁻ 4 种类型的植株(表 2)。无选择标记而目的基因阳性的转基因纯合植株的总得率为 9 .87% ,这些植株生长正常 ,株高、分蘖、穗长、单穗粒数等参数与对照相仿(资料未显示)。PCR 和 RT-PCR 检测结果显示外源基因已整合到转基因水稻基因组中并转录(图

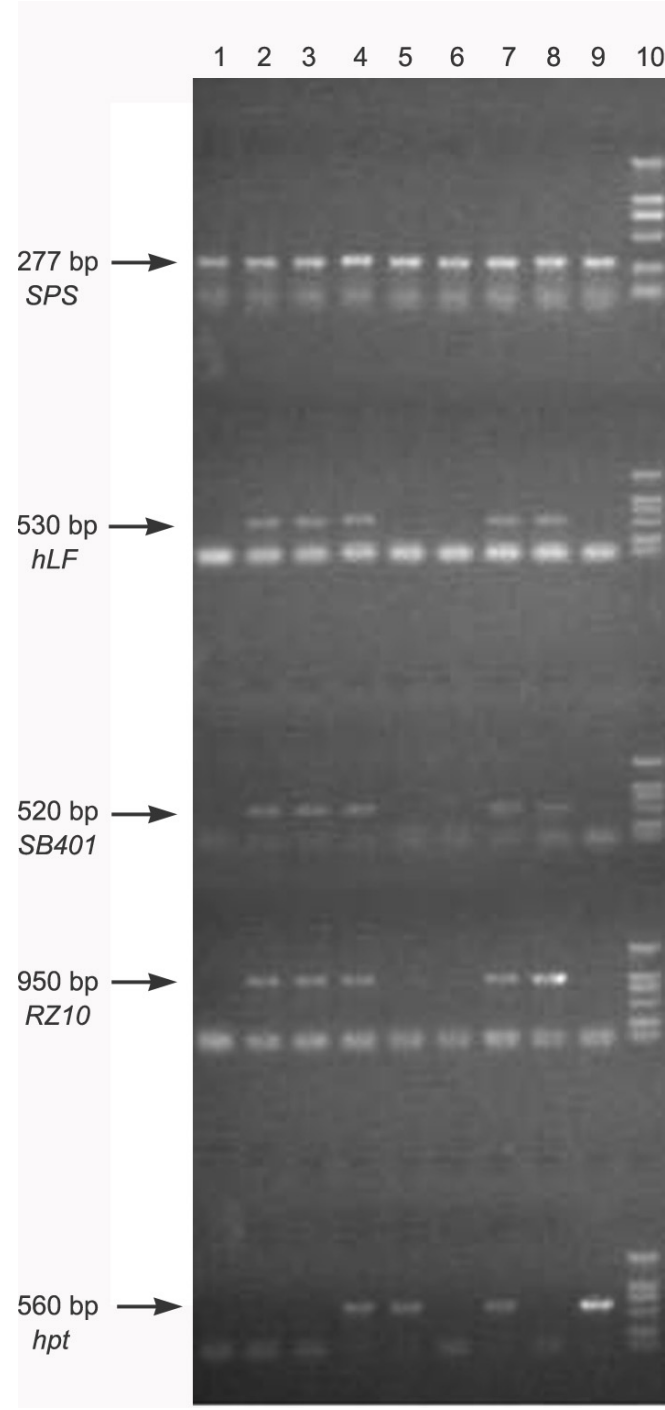


图 3 花培转基因水稻植株中目的基因的 RT-PCR 检测
Fig . 3 . RT-PCR analysis of dihaploid plants .

1 - 野生型水稻(阴性对照) ; 2 ~ 9 - 转基因水稻单株 ;10 - DL2000(TaKaRa)。
1 , CK⁻ (Oryza sativa L . subsp . *japonica* , brittle culm) ; 2 to 9 , Transgenic rice lines ; 10 , DL2000(TaKaRa) .

2 ,图 3)。以上结果表明 ,将遗传转化技术与花药培养相结合 ,快速获得了纯合的 ,同时含人乳铁蛋白(hLF)、高赖氨酸(SB401)、高甲硫氨酸(RZ10)基因但不含潮霉素抗性基因的二倍体转基因水稻(图 4)。

2.3 双 T DNA 区三价表达载体在转化过程中部分目的基因丢失

在对 T₀ 代和 DHT₀ 代进行选择标记基因及目的基因检测的过程中 ,发现处于同一 T- DNA 区不同启动子启动的 3 个目的基因 ,在转基因植株中的出现频率并不完全一致。T₀ 代的 45 株目的基因阳性植株 PCR 检测结果表明有 1 株包含 hLF无

表 2 转基因花培群体(DHT₀ 代)基因型的分离

Table 2 . Genotype distribution in dihaploid transgenic rice plants .

DHT ₀ 代群体编号 Code of DHT ₀ plant	S ⁺ G ⁺ 1)	S ⁺ G ⁻ 1)	S ⁻ G ⁺ 1)	S ⁻ G ⁻ 1)	总株数 Total
1	10	2	3	6	21
2	19	7	4	31	61
3	13	6	5	15	39
4	22	7	9	18	56
5	4	2	2	4	12
总计 Total	68	24	23	74	189

1) DHT₀ 代群体 PCR 检测阳性(+)或阴性(-) ;S - 选择标记区 ;G - 目的标记区。
1) Amplified DNAs were present(+) or absent(-) ;S , Selection marker region ;G , Target gene region .

*SB401*和*RZ10* ,1 株无*hLF*有*SB401*和*RZ10*。RT-PCR 结果显示 ,DHT₀ 代的 91 株目的基因阳性植株中有 6 株有*hLF*无*SB401*和*RZ10* ,3 株无*hLF*有*SB401*和*RZ10*(图 5)。

3 讨论

植物转基因对改良植物品质、增加抗性、提高产量等都具有明显作用。尽管 WHO(1991)和 FDA(1994)已经声明 ,食物中的标记基因本身并无安全性问题 ,但是从转基因作物的食用和环境安全性考虑 ,人们对抗生素抗性基因是否有向其他生物转移的可能性仍有诸多疑虑^[12 14]。此外 ,就育种方法而言 ,转基因品种中标记基因的存在 ,对它再次进行转基因聚合育种也带来一定困难^[15]。因此 ,转基因植物标记基因的剔除 ,是转基因育种的一个重要内容。本研究表明利用双 T-DNA 载体转化水稻 ,再通过花药培养技术即可快速获得有目的基因却不含选择

标记的转基因株系 ,有效消除选择标记基因的安全隐患 ,大大加快了研究成果的应用速度。在本研究中 ,无选择标记而目的基因阳性的转基因纯合植株的得率为 9 .87%。于恒秀等^[6]用双 T-DNA 双元载体转化水稻 ,T₀ 代共转化阳性的转基因植株自交后得到 T₁ 代植株中无选择标记基因而有目的基因 *AP1* 的比例介于 25% ~ 33%。张秀春等^[5]利用双 T-DNA 载体获得的无选择标记的转基因大豆 ,T₁ 代无选择标记基因而有目的基因的比例为 18. 75%。用同样的方法 ,Zhou 等^[3]报告 T₁ 代的无选择标记基因而有目的基因的比例为 19 .5%。由于这些 T₁ 代的目的基因存在纯合与杂合两种情况(在单拷贝插入情况下分离比例约为 1 2) ,因此虽然估算的纯合基因型比例与本实验基本一致 ,但仍需要继续加代和检测才能获得纯合的植株。而将双 T-DNA 载体转化与花药培养相结合的方法 ,仅一代就可获得纯合目的植株 ,大大加快了研究进程。

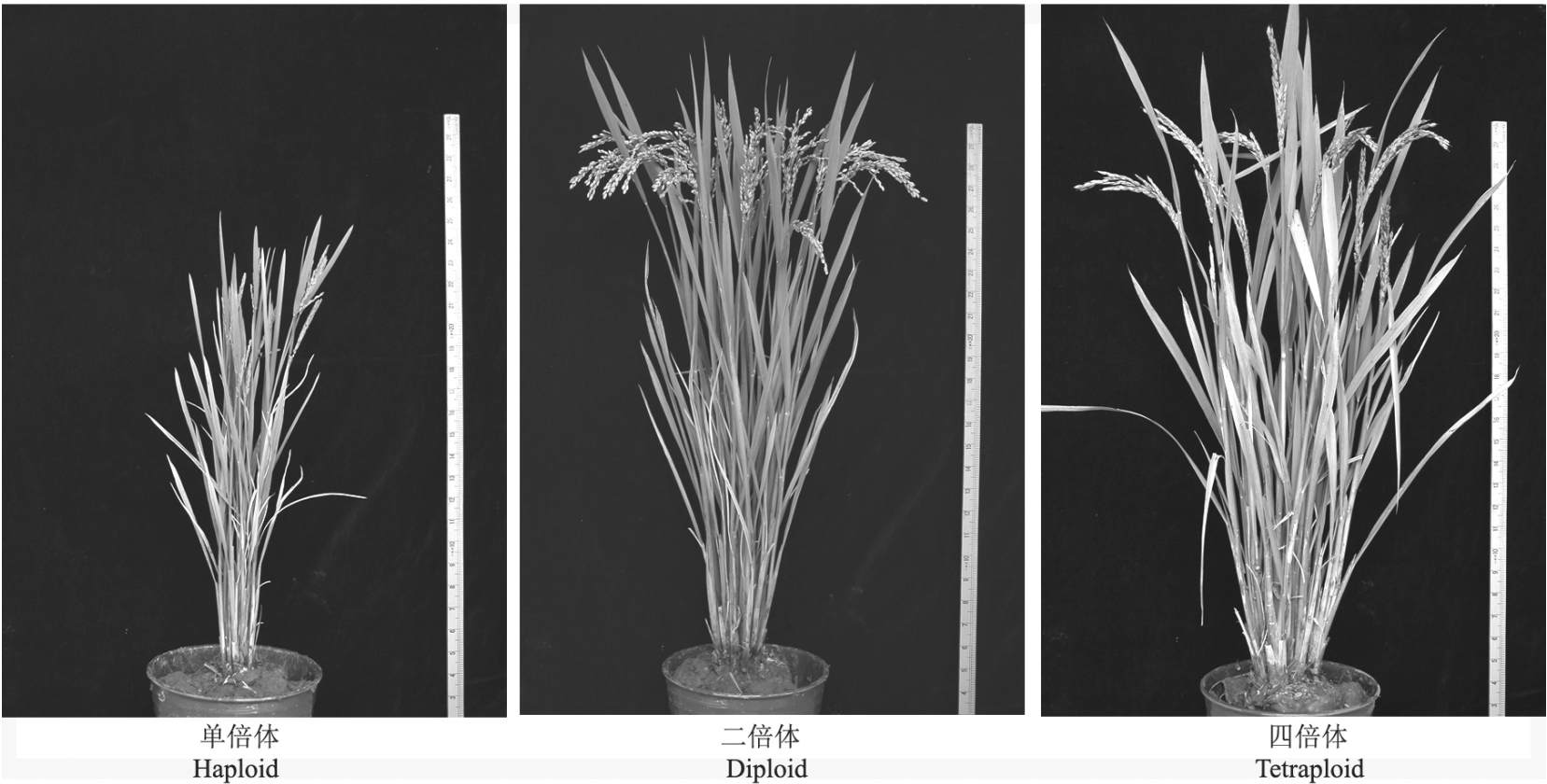


图 4 水稻花培群体中的单倍体、二倍体及四倍体
Fig . 4 . Anther culture derived haploid , diploid and tetraploid plants of rice .

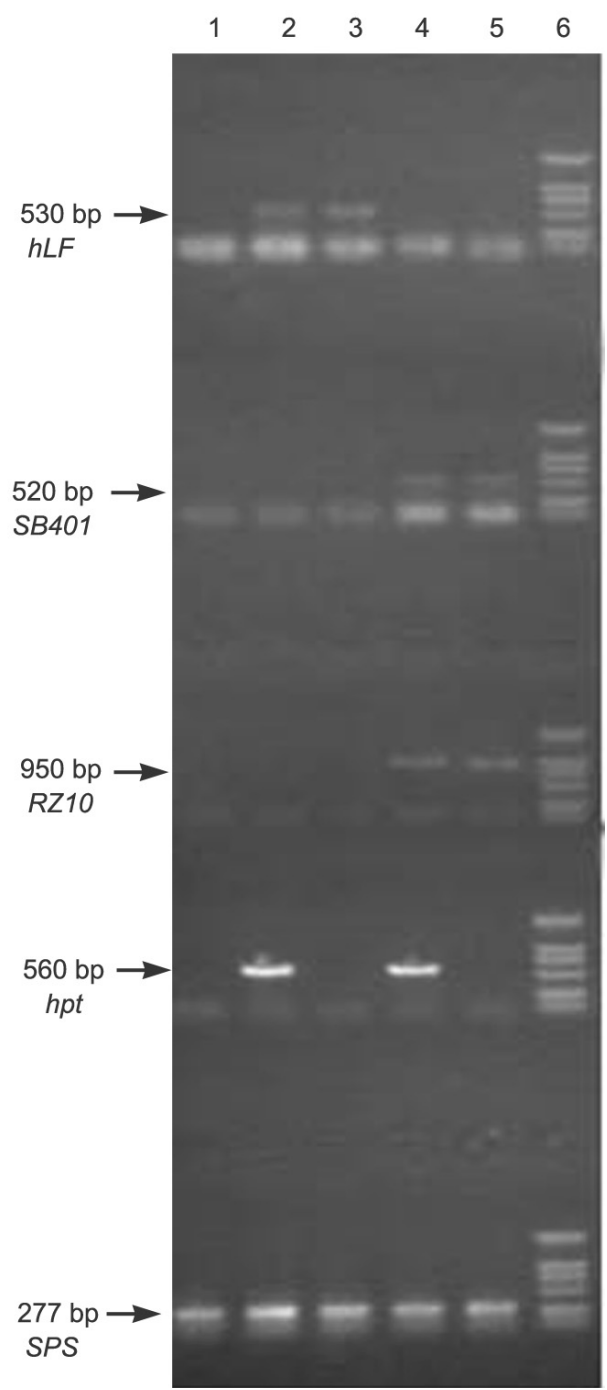


图 5 双 T-DNA 区二元三价表达载体在转化过程中目的基因部分丢失

Fig. 5 Some target genes of double T-DNAs binary vector with three interest genes being lost by *Agrobacterium* mediated transformation.

1 - 野生型水稻 (阴性对照) ; 2 - 有 *hLF* 无 *SB401* 和 *RZ10* , 有选择标记 ; 3 - 有 *hLF* 无 *SB401* 和 *RZ10* , 无选择标记 ; 4 - 无 *hLF* 有 *SB401* 和 *RZ10* , 有选择标记 ; 5 - 无 *hLF* 有 *SB401* 和 *RZ10* , 无选择标记 ; 6 - DL2000 (TaKaRa) .

1 , CK⁻ (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*, brittle culm) ; 2 , *hLF*⁺ *SB401*⁻ *hpt*⁺ ; 3 , *hLF*⁺ *SB401*⁻ *hpt*⁻ ; 4 , *hLF*⁻ *SB401*⁺ *hpt*⁺ ; 5 , *hLF*⁻ *SB401*⁺ *hpt*⁻ ; 6 , DL2000 (TaKaRa) .

本实验选取了选择标记和目的基因双阳性的 T₀ 代植株并按株系进行花药培养 , 获得 5 个 DHT₀ 代群体。对群体中的二倍体植株进行目的基因与选择标记基因的 PCR 检测结果表明 , 5 个株系中都有 S⁺ G⁺、S⁺ G⁻、S⁻ G⁺ 和 S⁻ G⁻ 4 种类型的植株。在农杆菌转化过程中 , 如果单拷贝插入的 2 个 T-DNA 分别独立插在不同源的染色体上 , 则其花培群体的分离比应为 1 1 1 1。但 2、4 号群体的分离比明显偏离上述分离比 (统计分析资料未显示) ,

而且 S⁺ G⁺ 和 S⁻ G⁻ 的比例明显高于 S⁺ G⁻ 和 S⁻ G⁺。出现这一现象 , 可能是多拷贝插入的后代发生分离所致 , 也可能是由于插入到同一染色单体上的双 T-DNA 结构在减数分裂期间发生了遗传交换 , 深入的研究还在进行中。本研究提示 , 转基因植株按单株进行花药培养对研究选择标记基因与目的基因在 T₀ 代株系中的插入方式和遗传规律是很有价值的。

转化一两个外源基因 , 往往不能满足育种家对多项农艺性状的要求 , 而多次转化又面临时间长、选择标记缺乏等难题 , 所以研究人员把多个外源基因一次性转入受体材料。Cao 等^[16] 使用多元载体 pYP1203E 转化水稻 , 该载体在同一 T-DNA 区包含选择标记基因 (*hpt*)、报告基因 (*GUS*) 以及另外 3 个各自独立使用启动子、终止子的外源基因 (*VHb*、*tzs* 和 *EPSPS*) , 在 113 株 T₀ 代转基因单株中发现有 8 株发生了一个或两个外源基因丢失的情况。本研究 45 株目的基因阳性的 T₀ 代株系中也有 2 株出现了部分目的基因丢失 , 推测大片的 T-DNA 区在转化过程中会发生不完整插入的现象。DHT₀ 代目的基因阳性的 91 株中有 9 株目的基因片段不完整 , 说明较长的插入片段在后代遗传过程中有丢失其中一个表达盒的可能 , 由于基因转录必须具有完整的表达盒 , 所以 RT-PCR 结果显示的是 *hLF* 的缺失或是 *SB401* 和 *RZ10* 的缺失。这可能是因为目的基因区在减数分裂过程中发生异常 (易位、倒位、交换等) , 也可能是由于逆转座子的插入 , 使部分目的基因沉默^[17]。载体 p13HSR 中 , 共用启动子的 *SB401* 和 *RZ10* 表达盒是否会出现丢失其中一个基因 , 另外一个正常表达的情况 , 我们的实验结果不能体现。这是因为 *RZ10* 是一个水稻内源的高甲硫氨酸含量的基因 , 为了便于检测 , 用 *SB401* 的序列设计了 *RZ10* 的 5 端引物 , 用 *RZ10* 的序列设计了 3 端引物 , 所以 *SB401* 和 *RZ10* 在检测结果中始终是连锁的。对这种可能性的研究需要构建其他特异的表达载体 , 转化受体材料后进行分析。我们的研究提示在作物育种过程中引入太大的表达载体可能并不合适 , 为了将多个基因组合在一起 , 需要探索更加切实可行的方法。

中国是水稻生产大国 , 随着育种技术的不断进步 , 水稻产量大幅增加 , 但是在收获稻谷的同时也收获了稻草。以收获指数为 0.5 匡算 , 每年收割的稻草达 2 亿 t。面对如此巨量的副产物 , 农民没有相应的回收利用措施 , 只好田间焚烧 , 不仅严重污染环

境,而且每到秋收季节,浓烟弥漫,机场被迫关闭,造成重大经济损失和不良社会影响;另一方面,我国南方大多数地区的畜牧饲料匮乏,需要依靠外地调入甚至进口,而稻草虽然营养全面,却因纤维素含量过高,不易被动物分解利用,只好付之一炬。本研究将人乳铁蛋白、赖氨酸和甲硫氨酸导入水稻脆茎稻,期望通过转基因提高秸秆的营养价值,从根本上打破烧秸秆、污染环境、缺饲料的农业怪圈,促进农业的可持续发展。目前,我们正在测定外源基因在转基因株系中的表达产物,结果将另文发表。

谢辞:中国农业大学敖光明教授提供基因 *SB401* 和 *RZ10*,集美大学梁亮同学参与部分工作,特致谢忱。

参考文献：

[1] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformations free from selection marker. *Plant J*, 1996, 10:165-174.

[2] McCormac A C, Fowler M R, Chen D F, et al. Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation. *Transgenic Res*, 2001, 10:143-155.

[3] Zhou H Y, Chen S B, Li X G, et al. Generating marker-free transgenic tobacco plants by *Agrobacterium* mediated transformation with double T-DNA binary vector. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(9):1103-1108.

[4] 唐 俐,刘巧泉,邓晓湘,等.无抗性选择标记的转高赖氨酸蛋白(LRP)基因籼稻恢复系的获得.作物学报,2006,32(8):1248-1251.

[5] 张秀春,彭明,吴坤鑫,等.利用双T-DNA载体系统培育无选择标记转基因大豆.大豆科学,2006,5(4):369-372.

[6] 于恒秀,刘巧泉,王 玲,等.无抗性选择标记转 *API* 基因抗病水稻新品系的选育.中国农业科学,2005,38(12):2373-

237.

[7] 斯华敏,傅亚萍,肖 晗,等.转基因水稻经花药培养获得纯系的研究.中国水稻科学,1999,13(1):19-24.

[8] 傅亚萍,斯华敏,朱正歌,等.农杆菌转化花粉愈伤组织获取纯合的转基因水稻植株.浙江大学学报:农业与生命科学版,2001,27(4):407-410.

[9] 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. *Plant J*, 1994, 6:271-282.

[10] Zhuo L S, Si H M, Cheng S H, et al. Phenylacetic acid stimulation of direct shoot formation in rice (*Oryza sativa* L.) anther and somatic tissue cultures. *Plant Breeding*, 1996, 115:295-300.

[11] 卢扬江,郑康乐.一种简易提取水稻DNA的方法.中国水稻科学,1992,6(1):47-48.

[12] Widmer F, Seidler R J, Watrud L S, et al. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Mol Ecol*, 1996, 5:603-613.

[13] Widmer F, Seidler R J, Donegan K K, et al. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol Ecol*, 1997, 6:1-7.

[14] Kohli A, Griffiths S, Palacios N, et al. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV35S promoter and confirms the predominance of micro-homology mediated recombination. *Plant J*, 1999, 17:591-601.

[15] Yoder J I, Goldsbrough A P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Biotechnology*, 1994, 12:263-267.

[16] Cao M X, Huang J Q, Wei Z M, et al. *Agrobacterium* mediated multiple gene transformation in rice using a single vector. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2):233-242.

[17] Miyao A, Tanaka K, Murata K, et al. Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon rich regions of the genome. *Plant Cell*, 2003, 15(8):1771-1780.