中国水稻科学(*Chin J Rice Sci*)，2011，25(3)：243～248
http://www.ricesci.cn
DOI：10.3969/j.issn.1001-7216.2011.03.003

一种简便的获得无标记耐盐转基因水稻植株的 NaCl 有效筛选浓度选择法

赵　艳[1,2,*]　罗园园[1]　张晓丽[1]　郭龙彪[2]　钱　前[2,*]　董禹然[1]
([1]浙江工商大学 食品与生物工程学院，浙江 杭州 310012；[2]中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室/国家水稻改良中心，浙江 杭州 310006；* 通讯联系人，E-mail：yanzhao9918@163.com；qianqian188@hotmail.com)

A Simple Selection Method for Effective Screening Concentration of NaCl for Generating Marker-Free Salt-Tolerant Transgenic Rice

ZHAO Yan[1,2,*], LUO Yuan-yuan[1], ZHANG Xiao-li[1], GUO Long-biao[2], QIAN Qian[2,*], DONG Yu-ran[1]
([1]*College of Food Science, Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China*; [2]*State Key Laboratory of Rice Biology/Chinese National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China*; * *Corresponding authors, E-mail: yanzhao9918@163.com; qianqian188@hotmail.com*)

ZHAO Yan, LUO Yuanyuan, ZHANG Xiaoli, et al. A simple selection method for effective screening concentration of NaCl for generating marker-free salt-tolerant transgenic rice. Chin J Rice Sci, 2011, 25(3): 243-248.
Abstract: The relevance between inhibition rates of rice seed germination and mature embryo callus growth by NaCl at different concentrations was studied by using four japonica rice cultivars (Nipponbare, Xiushui 11, Wuyunjing 7 and Zhonghua 11) as materials. Results showed that there was a significant positive correlation between the inhibition rates of rice seed germination and mature embryo callus growth under salt stress (on NB medium containting NaCl). The NaCl concentration at which the inhibition rate of rice seed germination reached about 50% was concordant with the concentration at which the inhibition rate of mature embryo callus growth reached about 80%. These could be used as important references to determine the effective concentrations of NaCl for screening of transformed cells in rice transformation with salt-tolerant gene. The effective NaCl concentrations were 200 mmol/L for Nipponbare, Wuyunjing 7 and Zhonghua 11 and 250 mmol/L for Xiushui 11. Transgenic rice plants were successfully obtained with the NaCl concentration as screening standard in the transformation of Nipponbare and Xiushui 11 with salt-tolerant gene *BADH*. The transformation frequency of Nipponbare and Xiushui 11 were 38.9% and 32.0%, respectively. The method that the suitable concentration of NaCl for screening in rice transformation was determined by testing the inhibition rate of rice seed germination, it is free of resistance marker genes and easy to operate with short experimental duration.
Key words: rice; salt-tolerance gene; betaine aldehyde dehydrogenase gene; transformation; marker-free

赵　艳，罗园园，张晓丽，等. 一种简便的获得无标记耐盐转基因水稻植株的 NaCl 有效筛选浓度选择法. 中国水稻科学，2011，25(3)：243-248.
摘　要：以 4 个粳稻品种(日本晴、秀水 11、武运粳 7 号、中花 11)为材料，研究发现，在含 NaCl 的 NB 培养基上，NaCl 对水稻种子发芽的抑制率与对成熟胚愈伤组织生长的抑制率之间呈线性正相关。水稻种子发芽抑制率达 50%左右时的 NaCl 浓度与愈伤组织生长抑制率达 80%左右时的 NaCl 浓度一致，可以作为耐盐基因转化水稻时 NaCl 有效筛选浓度的重要参考。由此获得日本晴、武运粳 7 号和中花 11 NaCl 有效筛选浓度为 200 mmol/L，秀水 11 NaCl 有效筛选浓度为 250 mmol/L。采用上述浓度的 NaCl 对 *BADH* 基因转化的日本晴和秀水 11 愈伤组织进行筛选，成功获得了无标记基因的转基因水稻植株，转化率分别达到 38.9%和 32.0%。建立的 NaCl 筛选浓度确定法通过测定 NaCl 对水稻种子的发芽抑制率来确定水稻耐盐基因转化时合适的 NaCl 筛选浓度，操作简便，实验周期短，无需其他抗性标记基因。
关键词：水稻；耐盐基因；甜菜碱醛脱氢酶基因；转化；无标记基因
中图分类号：Q943；S511.03　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1001-7216(2011)03-0243-06

盐害是农业生产中最主要的非生物逆境之一[1]。水稻是我国主要的粮食作物，盐胁迫是影响水稻高产的重要原因之一，培育耐盐新品种对有效利用盐碱地，扩大耕地面积和增加我国粮食产量意义重大[2-3]。随着生物技术的快速发展，利用基因工程技术培育转耐盐基因植物是解决土壤盐渍化的重要途径之一[4]。然而，在植物转化中，经常需要利用抗性选择标记基因筛选以获得成功转化的细胞。目前在水稻转化中广泛使用的潮霉素抗性基因

收稿日期：2010-08-04；**修改稿收到日期**：2010-09-12。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30871511,30771317)；农业部转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX0810-003,2009ZX08001-022B)；国家 863 计划资助项目(2006AA10Z1A9)；中国博士后基金资助项目(20090450477)。

(*hpt*)、卡那霉素抗性基因(*npt* Ⅱ)和草丁膦抗性基因(*bar*)等抗性标记基因由于存在对食品和生态环境的潜在危害,已经成为影响转基因水稻商品化应用的主要障碍[5],当务之急是培育不含抗性标记基因、安全的转基因水稻。

Zhu 等[6]在耐盐基因转化中,直接采用 NaCl 作为筛选剂,不采用任何抗性选择标记基因,成功获得了转基因水稻植株。这为培育安全的耐盐转基因水稻新品系奠定了重要技术基础。但为了确定转化筛选时合适的 NaCl 浓度,需要比较不同浓度 NaCl 对水稻愈伤生长的影响,绘制 NaCl 浓度梯度与愈伤组织增重率之间的生长曲线。此过程需要对无菌培养的愈伤组织称重,程序比较繁琐且容易造成污染,如果连带培养皿称重则由于培养基水分蒸发等原因,结果容易出现误差。

种子是植物的主要繁殖器官,发芽指标法是在植物逆境生理试验中被广泛采用的一种有效的鉴定评价方法[7]。萌芽阶段的耐盐性在一定程度上也可以反映水稻品种的耐盐程度,盐胁迫下种子萌发率经常用于水稻耐盐性的早期选择与评价[8-11],是否能够采用 NaCl 对水稻种子发芽的抑制来反映它对愈伤组织生长的抑制呢? 本研究比较了不同浓度 NaCl 对水稻种子发芽和成熟胚愈伤组织生长的影响,分析 NaCl 抑制水稻种子发芽率和愈伤组织增重率之间的相关性,探讨利用 NaCl 对水稻种子发芽的抑制效果作为确定水稻耐盐基因转化中愈伤组织筛选所需 NaCl 浓度的可行性,评价此方法对来自山菠菜的耐盐基因甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH) cDNA[12]导入水稻的转化效果,旨在建立一种获得无标记耐盐转基因水稻植株的简便有效的 NaCl 筛选浓度选择法。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

供试材料为日本晴、中花 11、秀水 11 和武运粳 7 号等 4 个粳稻品种当年收获的种子。

1.2 基因

携带耐盐基因 *BADH* 质粒的农杆菌株 LBA4404 由本实验室构建。供试质粒带有 TMVR 的"Ω"片段翻译增强子和 Ubi 启动子[12],*BADH* 基因结构如图 1 所示。

1.3 培养基

NB 基本培养基:N6 大量元素+B5 微量元素+B5有机物+MS铁盐+100 mg/L肌醇+2.878 g/L脯氨酸+500 mg/L 谷氨酰胺+300 mg/L 水解酪蛋白+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶,pH 5.8。

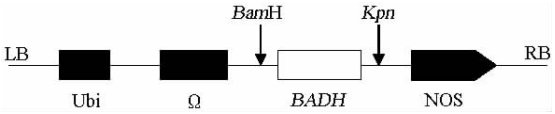


图 1 *BADH* 基因载体

Fig. 1. The schematic gene construct of *BADH*.

LB-T-DNA 左边界; Ubi-泛素启动子; Ω-TMVR 翻译增强子; *BADH*-甜菜碱醛脱氢酶基因编码区; NOS-胭脂碱合酶终止子; RB-T-DNA 右边界。

LB, T-DNA left bonder; Ubi, Ubiquitin promoter; Ω, TMVR translation enhancer; *BADH*, Betaine aldehyde dehydrogenase gene coding region; NOS, Nopaline synthase terminator; RB, T-DNA right bonder.

诱导与继代培养基:在 NB 基本培养基上附加 2 mg/L 2,4-D。

含盐培养基:在相应培养基中添加一定浓度 NaCl。

NaCl 筛选培养基:在 NB 诱导与继代培养基中添加适宜浓度 NaCl 和 300 mg/L 羧苄青霉素。

分化培养基:在 NB 基本培养基中添加 3 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA 和 13 g/L 山梨醇。

生根培养基:在 1/2MS 培养基中添加 2 mg/L MET。

1.4 种子消毒

在无菌条件下,用 70%乙醇浸泡种子 1 min,蒸馏水洗涤 3 次,再用 30%NaClO(每 500 mL 加入 1 滴吐温 80)浸泡 15 min 后,蒸馏水洗涤 3 次,重复 1 次,采用不含吐温 80 的 30% NaClO,用无菌滤纸吸干种子表面水分,无菌条件下接种到合适培养基上。

1.5 NaCl 抑制发芽试验

将消毒后的水稻种子接种至含盐基本培养基上,NaCl 添加量分别为 100、150、200 和 250 mmol/L,28℃下光照培养,7 d 后统计发芽率,以基本培养基上水稻种子的发芽率为对照,计算不同浓度 NaCl 对水稻种子的发芽抑制率。

1.6 愈伤组织诱导继代

将消毒后的种子接种至诱导与继代培养基上,每 15 d 继代 1 次,28℃下暗培养。

1.7 NaCl 抑制愈伤生长试验

挑选经过一次继代有活力的颗粒状愈伤组织分割成约 3 mm 左右的小块,无菌条件下称重后转移至含盐诱导与继代培养基上,NaCl 添加量为 100、

150、200 和 250 mmol/L,28℃下暗培养,15 d 后称重,计算愈伤组织质量增加率,以诱导与继代培养基上水稻愈伤组织质量增加率为对照,计算不同浓度 NaCl 对愈伤组织生长抑制百分率。

1.8　采用 NaCl 筛选法将耐盐基因 *BADH* 转化日本晴和秀水 11

携带耐盐基因质粒 *BADH* 的农杆菌株 LBA4404 在添加 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 YEB 液体培养基中活化,直到 OD_{600} 为 0.3 左右。将日本晴和秀水 11 的愈伤组织浸泡其中,振荡 20 min,用含 300 mg/L 羧苄青霉素的无菌水洗涤愈伤组织 5 次,并用无菌滤纸吸干愈伤组织表面水分,移至 NaCl 筛选培养基筛选两轮,每轮 15 d。将得到的抗性愈伤转移至分化培养基上培养 15 d,得到的苗转移至生根培养基培养 15 d,再将苗移至大田。

1.9　转基因植株的 PCR 检测

按 Edwards 等[13]的方法提取待测的叶片总 DNA。PCR 体系为 20 μL,包括 3 μL 模板,1 μL *Taq* 酶,2 μL dNTPs,2 μL 10×缓冲液,2 μL 引物。引物序列如下[12]:*BADH* 基因引物 P1 序列为 5′-AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTC-3′;引物 P2 序列为 5′-TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCC-3′,用它可在 *BADH* 基因中扩增出约 1500 bp 的 DNA 特异片段。PCR 扩增条件为:94℃下预变性 2 min;94℃下变性 30 s,50℃下退火 30 s,72℃下延伸 1.5 min,36 个循环;72℃下延伸 10 min。扩增产物加 5 μL 上样缓冲液,在 1%琼脂糖凝胶上以 140 V 电压电泳 30 min,然后在紫外灯下观测拍照。

1.10　数据处理

发芽率=发芽种子数/接种种子数×100%;

发芽抑制率=(对照种子发芽率−含盐培养种子发芽率)/对照种子发芽率×100%;

愈伤组织质量增加率=(培养后愈伤鲜质量−接种愈伤初始鲜质量)/接种愈伤初始鲜质量×100%;

愈伤生长抑制率=(对照愈伤质量增加率−含盐培养愈伤质量增加率)/对照愈伤质量增加率×100%;

每组实验重复 3 次,取平均值。利用 SPSS 17.0 软件分析 NaCl 对愈伤组织生长的抑制率与对水稻种子发芽的抑制率之间的相关性。

转化率=PCR 阳性株数/感染愈伤组织数×100%。

PCR 阳性率=PCR 阳性植株数/再生绿苗数×100%。

2　结果与分析

2.1　不同浓度 NaCl 对水稻种子发芽的抑制

在 NB 基本培养基中,日本晴、秀水 11、武运粳 7 号和中花 11 等 4 个粳稻品种的发芽能力存在差异,其中发芽率最高的是日本晴,达到 85.0%,最低的是中花 11,只有 48.3%(表 1)。由于 4 个品种的种子存放条件一致,发芽率差异的原因可能与收获后种子干燥状态有关,但我们推测主要原因很可能在于不同品种种子对实验设定的萌发条件的适应性存在差异(本研究采用的萌发条件比较特殊,是消毒

表 1　不同浓度 NaCl 对水稻种子发芽率的抑制效果

Table 1. The inhibitive effect of NaCl at different concentrations on rice seed germination.　%

品种与指标 Rice cultivar and character	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol·L^{-1})				
	0	100	150	200	250
日本晴 Nipponbare					
发芽率 Seed germination rate	85.0±1.5	55.0±1.3	50.9±1.1	38.3±0.7	29.2±0.9
发芽抑制率 Seed germination inhibition rate	−	35.3±0.4	40.5±0.3	54.9±0.1	65.6±0.5
秀水 11 Xiushui 11					
发芽率 Seed germination rate	80.7±0.8	61.5±0.7	50.0±1.6	43.7±1.1	33.7±0.8
发芽抑制率 Seed germination inhibition rate	−	23.7±0.2	38.0±1.4	45.8±0.9	58.2±0.6
武运粳 7 号 Wuyunjing 7					
发芽率 Seed germination rate	75.0±1.2	66.7±1.3	47.0±1.7	40.0±0.9	36.2±1.2
发芽抑制率 Seed germination inhibition rate	−	11.1±0.8	37.3±1.4	46.7±0.6	51.8±0.8
中花 11 Zhonghua 11					
发芽率 Seed germination rate	48.3±1.7	45.1±1.7	35.4±1.9	20.0±2.2	15.2±1.9
发芽抑制率 Seed germination inhibition rate	−	6.6±0.2	27.4±1.6	58.6±3.2	68.5±1.8

表 2 不同浓度 NaCl 对水稻成熟胚愈伤组织生长的抑制

Table 2. The inhibitive effect of NaCl at different concentrations on callus growth.

品种与指标 Rice cultivar and character	NaCl 浓度 NaCl concentration/(mmol·L^{-1})				
	0	100	150	200	250
日本晴 Nipponbare					
愈伤初始接种量 Callus initial weight/g	0.150 ± 0.057	0.222 ± 0.176	0.262 ± 0.121	0.175 ± 0.088	0.162 ± 0.115
15 d 后愈伤量 Callus weight 15 d after treatment/g	1.118 ± 0.124	0.930 ± 0.060	0.984 ± 0.012	0.398 ± 0.028	0.366 ± 0.018
质量增加率 Mass increasing rate/%	643.71 ± 2.22	319.28 ± 2.51	276.15 ± 1.23	127.45 ± 0.46	125.52 ± 1.04
生长抑制率 Growth inhibition rate/%	—	50.4	57.1	80.2	80.5
秀水 11 Xiushui 11					
愈伤初始接种量 Callus initial weight/g	0.171 ± 0.015	0.205 ± 0.007	1.006 ± 0.010	0.274 ± 0.012	0.198 ± 0.006
15 d 后愈伤量 Callus weight 15 d after treatment/g	0.710 ± 0.022	0.534 ± 0.093	2.358 ± 0.031	0.462 ± 0.139	0.296 ± 0.028
质量增加率 Mass increasing rate/%	314.89 ± 0.21	161.22 ± 0.05	134.45 ± 0.01	68.33 ± 0.03	49.44 ± 0.01
生长抑制率 Growth inhibition rate/%	—	48.8	57.3	78.3	84.3
武运粳 7 号 Wuyunjing 7					
愈伤初始接种量 Callus initial weight/g	0.202 ± 0.031	0.193 ± 0.022	0.390 ± 0.039	0.291 ± 0.029	0.436 ± 0.024
15 d 后愈伤量 Callus weight 15 d after treatment/g	0.809 ± 0.103	0.682 ± 0.187	0.859 ± 0.137	0.427 ± 0.198	0.639 ± 0.150
质量增加率 Mass increasing rate /%	301.34 ± 0.44	254.03 ± 0.30	117.83 ± 0.12	47.01 ± 0.08	46.71 ± 0.05
生长抑制率 Growth inhibition rate/%	—	15.7	60.9	84.4	84.5
中花 11 Zhonghua 11					
愈伤初始接种量 Callus initial weight/g	0.220 ± 0.067	0.241 ± 0.062	0.396 ± 0.033	0.277 ± 0.066	0.263 ± 0.072
15 d 后愈伤量 Callus weight 15 d after treatment/g	0.781 ± 0.034	0.811 ± 0.012	1.092 ± 0.171	0.394 ± 0.138	0.373 ± 0.151
质量增加率 Mass increasing rate /%	254.19 ± 0.72	236.14 ± 0.55	175.39 ± 0.15	42.45 ± 0.10	41.94 ± 0.21
生长抑制率 Growth inhibition rate/%	—	7.1	31.0	83.3	83.5

去壳后直接接种在培养基上)。而在含盐培养基中处理时,随着 NaCl 浓度的上升,各品种的发芽率逐渐降低,并且用发芽抑制率来描述这种现象时不同品种间变化趋势比较一致。其中,日本晴和中花 11 对 NaCl 比较敏感,NaCl 浓度为 200 mmol/L 时发芽抑制率达到 50%以上,分别为 54.9%和 58.6%。而秀水 11 和武运粳 7 号对 NaCl 耐性较强,NaCl 浓度为 250 mmol/L 时发芽抑制率达到 50%以上,分别为 58.2%和 51.8%。

2.2 不同浓度 NaCl 对水稻成熟胚愈伤组织生长的抑制

从表 2 可知,在诱导及继代培养基中,日本晴、秀水 11、武运粳 7 号和中花 11 这 4 个粳稻品种的愈伤组织生长能力存在差异。在 NB 基本培养基中,质量增加率最高的是日本晴,达到 643.71%,最低的是中花 11,只有 254.19%。在含盐培养基中,随着 NaCl 浓度的上升,各品种的愈伤的生长明显受到抑制,而且褐化逐渐加重。其中,日本晴、武运粳 7 号和中花 11 对 NaCl 比较敏感,NaCl 浓度为 200 mmol/L 时愈伤组织生长抑制率达到 80%以上,分别为 80.2%、84.4%和 83.3%,而秀水 11 对 NaCl 耐性较强,NaCl 浓度为 250 mmol/L 时愈伤组织生长抑制率才达到 80%以上。

2.3 不同浓度 NaCl 对水稻成熟胚愈伤组织生长抑制率与对种子发芽抑制率的相关性

NaCl 对愈伤组织生长的抑制率与对水稻种子发芽的抑制率之间的相关性分析表明,供试的日本晴、秀水 11、武运粳 7 号和中花 11 这 4 个品种中两个指标的 Pearson 相关系数分别为 0.951(P=0.049)、0.954(P=0.045)、0.991(P=0.009)和 0.989(P=0.011),显示 NaCl 对愈伤组织生长的抑制率与对水稻种子发芽的抑制率之间呈线性正相关。这说明 NaCl 对水稻种子的发芽抑制率可以反映其对愈伤组织生长的抑制情况。

根据常规的 NaCl 浓度梯度对愈伤组织质量增加率之间的生长曲线,Zhu 等[6]发现水稻愈伤组织在含 200 mmol/L 和 250 mmol/L 的 NaCl 培养基中培养时,生长受抑程度达到稳定期,即愈伤组织质量增加少且两者差异不大,故选择 200 mmol/L NaCl 为有效筛选浓度。这也是在转基因操作中普遍采用的筛选剂有效浓度选择方法。在本研究中,当愈伤组织生长受抑程度达到稳定期时,愈伤组织生长抑制率达到 80%以上,因此,可确定愈伤组织生长抑制率达 80%以上的 NaCl 浓度为合适的筛选浓度。日本晴、武运粳 7 号和中花 11 号的 NaCl 有效筛选浓度 200 mmol/L,秀水 11 的 NaCl 有效筛选浓度 250 mmol/L。在相应的 NaCl 浓度下,3 个供试水稻品种的种子发芽抑制率达 50%以上,只有武运粳 7 号种子发芽抑制率稍低(为 46.7%),但也接近 50%。因此,使水稻种子发芽抑制率达到 50%左右的 NaCl 浓度可作为耐盐基因转化筛选时的重要参考。

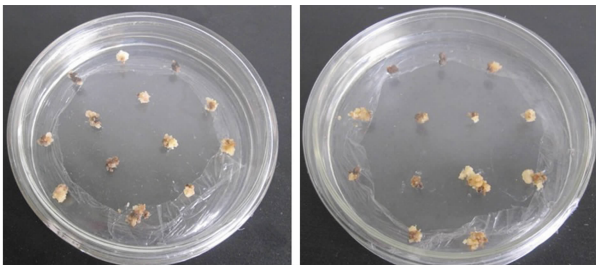


图 2　NaCl 对 *BADH* 基因转化日本晴(左)和秀水 11(右)愈伤组织的筛选效果

Fig. 2. The screening effect of NaCl on *BADH* transformed Nipponbare (left) and Xiushui 11(right) calli.

2.4　NaCl 对耐盐基因 *BADH* 转化日本晴和秀水 11 的筛选效果

根据上述研究结果,日本晴和秀水 11 的愈伤组织经过携带 *BADH* 基因的农杆菌转化后,分别移至含 200 mmol/L 和 250 mmol/L NaCl 筛选培养基中进行筛选,转化未成功的细胞褐化死亡,转化成功的细胞生长旺盛,颜色淡黄,筛选效果显著(图 2)。两轮筛选后的愈伤组织分化成苗。

采用 PCR 法对再生植株中 *BADH* 基因进行检测,计算 *BADH* 基因对水稻的转化率(图 3 和表 3)。采用 NaCl 筛选法成功实现了 *BADH* 基因对水稻的转化,经过 PCR 验证,日本晴和秀水 11 的转化率分别为 38.9%和 32.0%。

3　讨论

在本研究设定的条件下,虽然各品种发芽率存在差异,但随着 NaCl 浓度增加,不同水稻品种的发芽率逐渐降低,成熟胚愈伤组织的质量增加率也逐渐降低。前人研究表明,盐胁迫下水稻种子发芽率能在一定程度上反映品种的耐盐性[2,7-11],并且不同浓度的 NaCl 对水稻愈伤组织生长的抑制规律使得 NaCl 可以作为耐盐基因转化水稻时的有效筛选剂[6]。本研究发现水稻成熟胚愈伤组织的耐盐性与种子的耐盐性表现一致,说明水稻成熟胚愈伤组织对 NaCl 的耐受能力可能取决于其品种的耐盐性。分析表明,在供试的 4 个粳稻品种中,NaCl 对水稻种子的发芽抑制率与成熟胚愈伤组织生长的抑制率呈线性正相关。根据常规的 NaCl 浓度梯度对愈伤组织质量增加率之间的生长曲线,确定愈伤组织生长抑制率为 80%左右的 NaCl 浓度为合适的筛选浓度,与此相应的 NaCl 浓度对 4 个品种水稻种子的发芽抑制率均在 50%左右。因此,可选取对水稻种子的发芽抑制率在 50%左右的 NaCl 浓度作为耐盐基因转化中的筛选浓度。

采用 G418 筛选农杆菌介导的耐盐基因 *BADH* 的转化,其效率为 10%左右[14-15]。采用本研究建立的 NaCl 筛选法,*BADH* 的转化效率在 30%以上,显著高于采用 G418 筛选时的转化率,说明 NaCl筛选比传统的G418筛选更有效。Zhu 等[6]

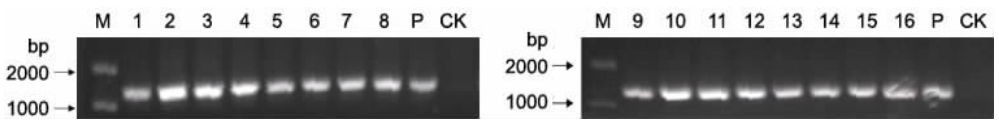


图 3　转基因水稻植株中 *BADH* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 3. PCR amplification of the *BADH* gene in transgenic rice plants.

M — DNA 分子量标准 DL2000; P — BADH 质粒阳性对照; CK —非转基因植株阴性对照; 1～8 —日本晴转基因植株; 9～16 —秀水 11 转基因植株。

M, DNA molecular ladder marker DL2000; P, Plasmid BADH (positive control); CK, Non-transgenic plants(negative control); Lanes 1 to 8, Transgenic plants of Nipponbare; Lanes 9 to 16, Transgenic plants of Xiushui 11.

表 3　*BADH* 基因采用 NaCl 筛选法对日本晴和秀水 11 的转化效率

Table 3. The transformation frequencies of Nipponbare and Xiushui 11 with *BADH* gene by NaCl screening method.

品种 Rice cultivar	感染愈伤数 Number of co-culture calli	再生绿苗数 Number of plantlets regenerated	PCR 阳性植株数 Number of PCR positive plants	PCR 阳性率 PCR positive rate/%	转化率 Transforamtion frequency/%
日本晴 Nipponbare	90	38	35	92.1	38.9
秀水 11 Xiushui 11	94	32	30	94.8	32.0

报道采用NaCl作为筛选剂,脱水应答蛋白基因(*DREB*)和转运蛋白基因(*SOS1*)两个耐盐基因对台农67和日本晴的转化效率在10%左右,比本研究建立的NaCl筛选法低。原因可能在于本研究建立的NaCl筛选法是经过两轮筛选后,移至无NaCl筛选剂的分化培养基上的,消除了分化阶段NaCl对愈伤组织分化的抑制;而Zhu等[6]的转化方法是经过两轮筛选,在分化培养基中也添加了一定浓度的NaCl。本研究结果表明,NaCl筛选法将耐盐基因转化水稻时,经筛选获得的抗性愈伤在分化培养基中无需添加筛选剂也能成功获得转化植株。

传统的转化方法,为了确定转化筛选时合适的NaCl浓度,绘制NaCl浓度梯度与愈伤组织增重率之间的生长曲线,实验周期长,从诱导愈伤开始,经过一次继代的愈伤接种到不同浓度NaCl培养基再生长15 d才能有结果,一共需要45 d左右。本研究通过测定NaCl对水稻种子的发芽抑制率即可确定所需NaCl浓度,只需要7 d,大大缩短了研究周期。总体上看,本研究建立的NaCl筛选法简便、快速,不需其他抗性标记基因就能有效实现耐盐基因对水稻的转化,获得无抗性标记的安全耐盐转基因水稻植株,这对水稻耐盐基因工程意义重大。但本研究只选择了4个粳稻品种,该方法在其他粳稻品种和籼稻品种上的应用还需要进一步的验证。

参考文献:

[1] 张鹤山,刘 洋,田 宏,等. 黑麦种子在不同盐分胁迫下萌发特性的研究. 种子,2009,28(3):14-17.

[2] Rai M, He C, Wu R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice. *Transgenic Res*, 2009, 18: 787-799.

[3] 胡婷婷,刘 超,王健康,等. 水稻耐盐基因遗传及耐盐育种研究. 分子植物育种,2009,7(1):110-116.

[4] Wang Y, Xue Y, Li J. Towards molecular breeding and improvement of rice in China. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(12): 610-614.

[5] Darbani B, Eimanifar A, Stewart C N, et al. Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol J*, 2007, 2: 83-90.

[6] Zhu Z, Wu R. Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or herbicides. *Plant Sci*, 2008, 174: 519-523.

[7] 祁栋灵,韩龙植,张三元. 水稻耐盐/碱性鉴定评价方法. 植物遗传资源学报,2005,6(2):226-231.

[8] 方先文,汤陵华,王艳平. 耐盐水稻种质资源的筛选. 植物遗传资源学报,2004,5(3):295-298.

[9] 张燕红,袁 杰,王奉斌. 不同新疆水稻品种种子发芽耐盐性的比较. 安徽农学通报,2009,15(3):102-103.

[10] Hakim M A, Uraimi A, Begum S M, et al. Effect of salt stress on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(13): 1911-1918.

[11] Jamil M, Rha E S. Response of transgenic rice at germination and early seedling growth under salt stress. *Pak J Biol Sci*, 2007, 10(23): 4303-4306.

[12] 卢德赵,王慧中,华志华,等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得及其耐盐性研究. 科技通报,2003,19(3):179-182.

[13] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 1349.

[14] 卢德赵,祝水金,钱 前,等. *BADH*基因转化水稻的方法比较. 中国水稻科学,2003,17(4):323-327.

[15] 林秀峰,刘志铭. 转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得. 吉林农业科学,2005,30(2):7-9.