

籼稻成熟胚遗传转化体系影响因素的优化

曾晓珊^{1,2},戴良英^{1,3*},刘雄伦^{1,2},吴俊^{1,2},宁约瑟^{1,2},高佳^{1,3},王国梁^{1,4*}

(1. 湖南农业大学 水稻基因组学实验室,湖南 长沙 410128;2. 湖南农业大学 农学院,湖南 长沙 410128;

3. 湖南农业大学 生物安全科技学院,湖南 长沙 410128;4. 美国俄亥俄州立大学 植物病理学系,哥伦布 俄亥俄 43210)

摘要:以5个籼稻品种为研究材料,对影响籼稻成熟胚愈伤组织培养、愈伤组织与根癌农杆菌共培养的部分因素进行了研究。结果表明:适当提高硝态氮和铵态氮比例、1.0~2.5mg/L的2,4-D浓度有利于籼稻品种成熟胚愈伤组织的诱导;愈伤组织继代12d左右共培养效果较好;愈伤组织与农杆菌液共培养3d能获得50%以上的转化率。

关键词:籼稻;成熟胚;愈伤组织;组织培养;农杆菌介导

中图分类号:S511.21 文献标识码:A 文章编号:1001-8581(2007)08-0001-03

Optimization of Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in Indica Rice

ZENG Xiao-shan^{1,2}, DAI Liang-ying^{1,3*}, LIU Xiong-lun^{1,2}, WU Jun^{1,2}, NING Joeph^{1,2}, GAO Jia^{1,3}, WANG Guo-liang^{1,4*}

(1. Rice Genomics Laboratory, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 4. Department of Plant Pathology, Ohio State University, Columbus 43210, USA)

Abstract: Five indica rice cultivars were investigated to study several factors influential to transformation frequency. Appropriate higher ratio of nitrate nitrogen to ammonium nitrogen, 1.0~2.5mg/L 2,4-D were beneficial to indica rice callus inducement. The results of subculture time investigation showed that twelve days' culture conducted to callus activity. Advanced research results showed that three days' co-culture of callus and *A. tumefaciens* was beneficial to target gene's transformation.

Key words: Indica rice; Mature embryo; Callus; Tissue culture; *Agrobacterium*-mediated transformation

建立稳定、高效而可靠的再生体系是进行水稻遗传转化研究的基础。农杆菌介导转化籼稻体系的优化有诸多报道。1996年Rashid等^[1]报道成功获得籼稻转基因植株,但外源DNA在籼稻中的转化率极低。1999年Al-demita等^[2]转化籼稻,其稳定转化率仅在1%~5%之间。丁玉梅等^[3]将BT基因转入籼稻中,获得了较高的转化率。由于籼稻基因型较多,影响转化率的因素较为复杂,要获得高效、稳定的转化率,还需进一步进行优化^[4-6]。本研究以5个籼稻品种为研究材料,采用农杆菌介导法导入pCAMBIA1301质粒,并对籼稻成熟胚再

生体系的几个影响因素进行优化,以期提高籼稻转化效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料与农杆菌菌株 供试水稻品种为两系杂交稻恢复系“香丰187”、三系恢复系“527”、三系保持系“T98B”、“316B”、常规优质稻“湘早籼31号”,由湖南农业大学水稻研究所提供。

农杆菌菌株为EHA105,pCAMBIA1301质粒上含有*hpt*和*gus*基因(如图1所示)。

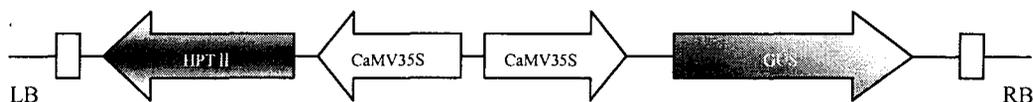


图1 pCAMBIA1301质粒T-DNA区域

1.2 培养基 基本培养基:MS^[7]、CC^[8]、NB^[9]、N₆^[10]、DL₃^[11]培养基。

愈伤组织诱导及继代培养基:基本培养基+3.0mg/L 2,4-D+3.0g/L phytigel,pH5.8。

共培养培养基:基本培养基+2.0mg/L 2,4-D+200μM acetosyringone+2.0g/L phytigel,pH5.2。

抗性筛选培养基:基本培养基+2.5mg/L 2,4-D+2.8g/L phytigel,pH5.8。

收稿日期:2007-04-16

基金项目:国家自然科学基金(30571063,30470990);湖南农业大学“芙蓉学者”计划;湖南省教育厅科学基金项目(04A024,05B028);湖南省杰出青年基金(06JJ10006)。

作者简介:曾晓珊(1977-),女,湖南永州人,博士研究生。*通讯作者:戴良英,王国梁。

预分化培养基:基本培养基+2.0mg/L6-BA+0.5mg/LNAA+3.0g/Lphytagel+5.0mg/LABA,pH5.9。

分化培养基:基本培养基+2.0mg/L6-BA+0.5mg/LNAA+4.0g/Lphytagel,pH5.9。

生根培养基:基本培养基+10.0g/Lmaltose+30.0g/Lsucrose+2.5g/Lphytagel,pH5.8。

1.3 水稻愈伤组织的诱导、继代培养 成熟种子去掉颖壳后,用70%的乙醇消毒1~2min,再用0.1%的升汞消毒15~20min,然后用无菌水洗4次,接种于诱导培养基上,25℃黑暗条件诱导愈伤组织。待愈伤组织长出后,继代于同一新鲜培养基上。统计愈伤诱导率(愈伤诱导率%=出愈胚数/成活胚数×100%),褐化率(褐化率%=褐化愈伤组织数/总愈伤组织数×100%)。

1.4 农杆菌转化 挑取培养好的农杆菌单菌落,接种于LB^[12]液体培养基中。次日吸取0.8~1.0mL菌液再培养。收集菌体,重悬于AAM^[13]培养液中,OD₆₀₀调节至0.8~1.0。将经预培养的愈伤组织浸泡于菌液中30min,晾干后置于共转化培养基上,25℃暗培养。共培养后进行GUS组织化学染色,统计瞬时表达率(瞬时表达率%=*gus*基因表达的愈伤组织数/总愈伤组织数×100%)。*gus*基因的组织化学分析,按Jefferson等^[14]的方法进行。

1.5 抗性愈伤组织的筛选和植株的再生 将共培养后的愈伤组织,用无菌水冲洗数次。晾干,转至筛选培养基上进行暗培养。两个星期后,将筛选后长出的愈伤组织转至预分化培养基。预分化后,挑选结构紧凑、胚性较好的愈伤组织团至分化培养基上,于光照条件(12h光照/12h黑暗、光强约为2000lx)、26℃左右下进行分化。幼芽长出后再移至1/2MS生根培养基上生根。待苗8~10cm高时,将植株转入土壤,在温室或大田生长成熟。叶片进行GUS染色时需用酒精脱色。

1.6 DNA提取及PCR检测 基因组DNA的提取按本实验室的方法进行。PCR反应扩增反应条件为:94℃3min~94℃50s~50℃50s~72℃1min,35个循环;72℃,最后延伸10min。引物序列为:Forward:5'cggtgactcggagtcag3';Reverse:5'tcgtctgcgcaatcgag3'。用1.2%琼脂糖凝胶电泳后,记录电泳结果。

2 结果与分析

2.1 不同硝态氮和铵态氮比例对籼稻成熟胚愈伤组织诱导率的影响 试验配制3种硝态氮和铵态氮比例的基本培养基诱导愈伤组织,愈伤组织平均诱导率如表1所示。

方差分析结果表明:各籼稻品种之间的平均诱导率存在显著差异,527的平均诱导率最高,为62.83%,香丰187最低,为39.42%。除香丰187外,其它各供试水稻品种平均愈伤诱导率均在2.3:1比例的培养基上最高,且显著地高于在其它两种比例培养基上的诱导率;香丰

187在2.5:1比例的培养基上平均愈伤诱导率最高,进一步加大比例,则诱导率下降。这说明适当提高培养基中硝态氮和铵态氮比例能显著提高籼稻成熟胚的愈伤组织诱导率;过高比例则不利提高籼稻成熟胚的愈伤组织诱导率。

表1 不同硝态氮和铵态氮比例基本培养基上

		成熟胚愈伤组织诱导率				%
硝态氮和铵态氮比例	527	湘早籼31号	316B	T98B	香丰187	
1.9:1	55.18	49.29	43.66	48.58	32.57	
2.3:1	73.19	62.25	64.52	49.11	36.10	
2.5:1	57.14	48.71	44.65	44.22	49.60	

2.2 2,4-D浓度对籼稻愈伤诱导率的影响 在NB培养基上,不同2,4-D浓度处理下的平均愈伤组织诱导率如表2所示。

由表2可知,各籼稻品种成熟胚愈伤组织诱导所需2,4-D浓度在1.0~2.5mg/L之间。527、T98B、316B、湘早籼31号在NB培养基上的愈伤诱导率有升-降-升-降的变化;将香丰187接种于另一种更适合的基本培养基上,亦得到相似的结果。方差分析结果亦表明:不同2,4-D浓度处理之间的平均愈伤诱导率亦存在极显著的差异。说明各个籼稻品种的愈伤诱导均有一个最适2,4-D浓度。

表2 不同浓度2,4-D处理愈伤诱导率

2,4-D (mg/L)	527	湘早籼31号	316B	T98B	香丰187	%
0.5	64.57	30.16	19.20	23.28	21.24	
1.0	71.23	46.90	31.64	44.83	34.34	
1.5	76.60	59.40	38.43	31.39	37.67	
2.0	61.91	44.64	51.51	45.21	39.76	
2.5	78.84	62.07	37.24	56.88	51.23	
3.0	71.04	58.99	43.87	43.25	51.36	

2,4-D不仅能有效地诱导植物细胞的脱分化,还能引起愈伤组织发生体细胞突变,对植物细胞分化有一定的抑制作用。因此,在不影响诱导率的条件下,应尽量少地降低2,4-D浓度。进一步的研究结果表明,527、T98B、316B、湘早籼31号、香丰187的适宜2,4-D浓度分别为1.5、1.0、2.0、1.5、2.0mg/L。

2.3 继代时间对籼稻愈伤组织褐化率的影响 影响成熟胚褐化的因素较为复杂,除了外植体的基因型、培养环境外,继代时间也是一个重要的因素。不同的继代时间,褐化率有成倍的差异。继代7、12、20d的褐化率如表3所示。26℃、NB培养基、暗培养条件下,褐化率随天数的增加而增大,继代7d与12d的褐化率差异并不显著,继代20d后的褐化率极显著地增大;且12d以后的愈伤组织逐渐变黄,到20d以后的愈伤组织较为松散,颜色较深,呈水渍状,不宜用作转化。

共培养的结果亦表明:继代12d左右的愈伤,其细胞

正处于旺盛的分裂状态, 转为胚性状态的时间短, 胚性好, 并能较快地接受外源 DNA 的进入, 较好地进入脱分化。

表 3 不同继代时间对愈伤组织褐化率的影响 %

继代时间 (d)	527	湘早籼 31 号	316B	T98B	香丰 187
7	0	9.50	61.90	14.30	23.80
12	9.50	19.05	76.19	23.80	33.60
20	14.30	33.33	95.24	28.57	52.38

2.4 共培养时间对转化效率的影响 愈伤组织与农杆菌共培养时间的长短直接影响到外源基因的导入效果。共培养时间不足, 外源 DNA 难以整合到基因组上; 时间过长, 过度生长的细菌细胞就会抑制植物细胞的正常生长, 甚至会造成植物细胞的死亡。取共培养 1、2、3d 的愈伤组织进行 GUS 组织化学染色, 瞬时表达率如表 4 所示。其中共培养 4d 的愈伤组织因农杆菌大量繁殖而未作 GUS 检测。

表 4 不同共培养时间对 GUS 瞬时表达率的影响 %

共培养时间 (d)	527	湘早籼 31 号	316B	T98B	香丰 187
1	4.76	4.76	4.00	5.50	8.27
2	21.05	21.27	27.78	33.33	36.84
3	50.00	60.00	52.17	60.87	61.90

结果表明: 培养 1d 后, 各籼稻品种的愈伤组织的瞬间表达率在 4.00% ~ 8.27% 之间; 2d 后, 瞬间表达率可得到提高至 21.05% ~ 36.84% 之间; 3d 后, 瞬间表达率可高达 50.00% ~ 61.90%。籼稻愈伤组织与农杆菌共培养 3d 转化效果最好。

2.5 抗性愈伤及转基因植株的 GUS 检测 各籼稻品种的愈伤组织及叶片的 GUS 染色情况如图 2(A、B、C、D) 所示。各籼稻品种的愈伤组织及叶片的 GUS 染色反应均呈阳性, 说明 *gus* 基因在各籼稻品种中得到有效表达。

2.6 PCR 结果 图 2(E) 为本研究中转基因植株的 *hpt* 基因 PCR 结果, 研究结果表明各籼稻品种的 *hpt* 基因转化率在 13.3% ~ 28.0% 之间。

3 讨论

基因型依赖是影响愈伤诱导率、离体组织培养性能及转化效率的因素之一。适当的硝态氮和铵态氮的比例, 有利于愈伤组织的诱导。原因可能是籼稻种子中所含硝态氮和铵态氮的比例较低, 成熟胚较为敏感; 当适当提高比例时, 愈伤组织的诱导率能相应得到提高。但过高的比例, 可能对胚产生毒害, 反而降低了诱导率。

植物激素是植物组织离体培养中不可缺少的物质。2,4-D 是一种外加的游离型生长素, 在诱导水稻成熟胚愈伤形成时有一个最适浓度, 低于这个浓度时, 愈伤组织细胞生长随浓度的增加而加快; 高于最适浓度时, 对植物产生毒害, 从而抑制细胞的增殖, 促进生长的效应随浓度

的增加而逐渐下降; 当 2,4-D 超过一定浓度后, 种子内源的束缚型生长素如吲哚乙酸 (IAA) 与束缚物分解, 成为游离型生长素, 使植物体内游离生长素呈稳衡状态, 达到适合愈伤组织细胞生长的水平, 并与氨基酸结合起一定的解毒功能。

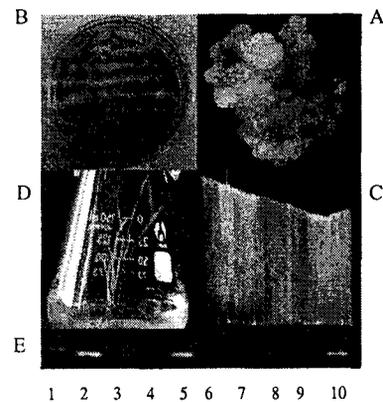


图 2 GUS 染色情况及 *hpt* 基因 PCR 结果
A 为愈伤组织筛选; B 为愈伤组织 GUS 检测; C 为叶片愈伤组织 GUS 检测; D 为转基因植株; E 为 PCR 结果: (1 为 DNAMarker, 2 为质粒扩增产物, 3 为阴性对照扩增产物, 4-10 为转基因植株扩增物)。

图 2 GUS 染色情况及 *hpt* 基因 PCR 结果

对不同籼稻品种进行培养基筛选及优化是建立籼稻成熟胚高效转化体系的基础。在优化培养基时, 必须对各个因素有针对性地进行优化, 以获得尽量多、胚性好的愈伤组织^[15]。但因不同基因型的籼稻品种内源激素的种类和含量不同, 优化工作较为繁重, 到目前为止, 在此方面的研究中, 未有进一步的报导。

继代时间的长短是影响成熟胚愈伤组织褐化和胚性的重要因素之一。褐化的原因可能是胚性愈伤组织中过氧化物酶和酸性磷酸酯酶活性下降, 转酯作用和解毒作用降低, 使得愈伤组织由于酚类物质的积累而发生褐变, 胚性愈伤组织继代培养中培养力降低^[16]。但过早继代因脱分化不完全或机械损伤易导致愈伤组织死亡。继代 10 ~ 12d 左右的愈伤组织细胞正处于旺盛的分裂状态, 能够较好地进入脱分化状态。

转化频率随共培养时间的延长相应提高。这可能是因为较长的共培养时间有利于酚类物质的吸附, 从而激活更多具有侵染能力的农杆菌, 进而提高转化频率。但由于在共培养培养基上不含任何抗生素, 植物细胞和细菌细胞都可以生长。而细菌细胞的生长周期要比植物细胞短得多, 生长较快, 如果培养时间过长, 过度生长的细菌细胞就会抑制植物细胞的正常生长, 造成植物细胞的死亡。因此, 为提高转化频率, 许多的科研者采取各种措施以延长共培养时间。共培养后, 延长愈伤组织的晾干时间, 能明显提高 *gus* 基因的瞬时表达率, 但并不利于外源基因转化效率的提高。这可能是延长晾干时间, 细胞易脱水死亡, 在后续的筛选继代中, 不能保持细胞的

(下转第 6 页)

较低,所以抗性比较弱,对农杆菌的耐受能力低,需要用更低的浓度进行感染。

参考文献:

- [1] 程振东,卫志明,许智宏.芸薹属作物的遗传转化[J].植物生理学通讯,1992,28(3):161~164.
- [2] 韩德俊,袁本威,胡甘,等.农杆菌介导的油菜遗传转化研究进展[J].西北农林科技大学学报,2005,33(11):18~22.
- [3] 钟蓉,朱峰,刘玉乐,等.油菜的遗传转化及抗溴苯腈转基因油菜的获得[J].植物学报,1997,39(1):22~27.
- [4] 刘后利,傅廷栋,高永同,等.甘蓝型黄籽油菜的发现及其遗传行为的研究[J].遗传学报,1979,6(1):54~57.
- [5] 肖达人.甘蓝型油菜种皮颜色与种子含油量的关系[J].作物学报,1982,8(2):245~255.
- [6] Hu X J. Studies on the relationship between seed-coat colour and pigment content in different types of rapeseed cultivars[J]. Cruciferae Newsletter, 1988, 13: 43~47.
- [7] Narasimhulu S B, Kirti P B, Mohapatra T, et al. Shoot regeneration in stem explants and its amenability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica carinata* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 359~362.
- [8] De Block M, De Brouwer D, Tenning. P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants[J]. Plant Physiol, 1989, 91: 694~701.
- [9] 程振东,卫志明,许智宏.根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生[J].植物学报,1994,36(9):657~663.
- [10] 周延清,蒋达和,蔡毓能,等.农杆菌介导的苏云金杆菌毒蛋白基因转基因油菜的初报[J].河南师范大学学报(自然科学版),1993,21(1):116~118.
- [11] Fry J, Barnason A, Horsch R B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 321~325.
- [12] 石淑稳,周永明,孙学成,等.甘蓝型油菜遗传转化体系的研究[J].华中农业大学学报,1998,17(3):205~210.
- [13] 周小梅,李君剑,赵军良,等.抗生素对农杆菌的抑制和对油菜外植体分化的影响[J].西北植物学报,2005,25(1):52~56.
- [14] 万萌,王敬乔,寸守铨,等.甘蓝型油菜雄性不育基因转化体系的探索[J].西南农业学报,1999,12(1):45~501.

(上接第3页)

活性。因此,适当的共转化时间,才能保持外源基因的表达。

参考文献:

- [1] Eashid H, Yokoi S, Toriyama K. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 727~730.
- [2] Aldemita R R and Hodges T K, 1999, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japonica and Indica rice varieties [J]. Planta, 1999(4):612~615.
- [3] 丁玉梅,曾黎琼,程在全,等.高效抗虫基因 *PinII* 转化水稻的研究[J].西南农业学报,2003,(16)4:27~32.
- [4] Roberta H S, Hood E E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons [J]. Crop Science, 1995, 35(2):301~309.
- [5] CHEN En-hui, PING Zhang, ZUO Shi-min, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-Mediated transformation efficiency in rice [J]. Rice Science, 2004, 11(4):181~185.
- [6] WANG Xiu-hong, SHI Xiang-yuan, WU Xian-jun, et al. The influence of endogenous hormones on culture capability of different explants in rice [J]. Agricultural Sciences in China, 2005, 4(5):343~347.
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physiol Plant, 1962, 15(3):473~497.
- [8] Portrykus I, Harms C T, Lorz H. Callus formation from cell culture protoplasts of corn [J]. Theor. Appl. Genet, 1979, 54: 209~214.
- [9] LI Liang-cai, RONG Da-qu. Alexandre de Kochko, An improved rice transformation system using the biolistic method [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 250~255.
- [10] Chu C C, Wang C C, Sun C S, et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources [J]. Sci Sin, 1975, 18(5):659~668.
- [11] Lin Y J, Zhang Qifa. Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice [J]. Plant Cell Reports, 2005, 23: 540~547.
- [12] Sambrook J, David W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆实验指南) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2002. 1595.
- [13] Toriyama K, Hinat K. Cell suspension and protoplast culture in rice [J]. Plant Sci, 1985, 46(3):179~183.
- [14] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system plant [J]. Mol Bio Rep, 1987, 5(4):387~405.
- [15] 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.
- [16] 刘清波,刘选明,周朴华.胚性愈伤组织继中的生理生化特性[J].湖南农业大学学报,1998,24(3):180~185.