

农杆菌介导水稻转化条件的优化

周玲艳, 姜大刚, 吴 豪, 庄楚雄

(华南农业大学 遗传工程室, 广东 广州 510642)

摘要:应用 TAC(transformation-competition artificial chromosome)载体和 pCambia1300 分别与农杆菌 LBA4404 组合转化水稻成熟胚愈伤组织, 探索了农杆菌转化的有关因素。结果表明: 共培养培养基上铺上 1 张滤纸有利于控制农杆菌的过度生长; 粳稻品种转化率明显高于籼稻; 干燥处理能有效杀死农杆菌, 并有利于提高转化率。预再生可提高抗性愈伤组织的再生率而提高转化率。

关键词: 水稻; 农杆菌; 转化

中图分类号: Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0043-03

植物转化是品种改良的重要手段, 同时也是植物基因克隆和功能分析不可缺少的一个步骤。植物的转化方法很多, 包括农杆菌介导法、基因枪法、电激法、PEG 法等, 农杆菌介导法具有简单、方便, 转化效率高, 可转化大片段^[1]等诸多优点而倍受欢迎。自 1983 年利用农杆菌转化烟草获得首例转基因植物以来, 农杆菌介导的遗传转化技术在双子叶植物中得到广泛而有效的应用。水稻、小麦、玉米等单子叶植物不是农杆菌的天然宿主, 因而农杆菌介导的转化技术在水稻等重要粮食作物上的应用曾一度进展缓慢。1994 年 Hiei^[2]证实农杆菌转化水稻的有效性, 相继许多人利用农杆菌转化水稻籼稻和粳稻品种均取得成功。目前, 值得研究的问题是如何建立一个高效、稳定的农杆菌转化体系。本研究选用了几个重要的栽培稻品种作为转化材料, 研究和探索农杆菌转化的有关因素, 以提高水稻的转化效率。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试材料为光温敏核不育系籼稻品种培矮 64S、粳稻品种农垦 58S、7001S 和中花 11 的成熟种子。

1.2 农杆菌菌株及质粒

农杆菌菌株为 LBA 4404, 质粒载体为 TAC(transformation-competition artificial chromosome)(由华南农业大学遗传工程室刘耀光研究员提供)及 pCambia1300。TAC 载体插入的外源片段为 50 kb, pCambia1300 插入的外源片段为 4.9 kb。

1.3 水稻愈伤组织的获得

水稻品种成熟种子去壳, 消毒后, 接种于诱导培

养基上, 26℃暗培养。7 d 后, 将成熟胚盾片处长出的愈伤组织分离, 继代于继代培养基上, 此后, 每 15 d 继代 1 次。

1.4 农杆菌培养及介导的水稻转化

挑取-70℃保存的农杆菌转化子在 YM 培养基(含 25 μg/mL Kan 和 25 μg/mL Str)上划线, 28℃暗培养 3 d, 取单菌落涂布于加有相同抗生素的 YM 培养基上, 28℃暗培养 2 d。用药匙刮取一定量的农杆菌悬浮于加有 100 μmol/L 乙酰丁香酮的 MB 液体培养基中, 使 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.8~1.0。挑选颜色新鲜、淡黄色、致密、生长旺盛的颗粒状胚性愈伤组织, 将愈伤组织和农杆菌菌液按一定的比例混合, 浸染 20 min。取出愈伤组织, 并用灭菌的滤纸吸去多余的菌液。将愈伤组织接到共培养培养基上, 26℃暗培养 2~3 d。

1.5 转化子的筛选和植株再生

将共培养后的愈伤组织取出放在有 3 层滤纸的灭菌培养皿中干燥 2~3 d。经干燥处理过的愈伤组织接入合适筛选压的筛选培养基上, 筛选 2 次, 每次 2~3 周。将抗性愈伤组织接入预再生培养基, 26℃光照培养 3 周, 再转入再生培养基上分化成苗。

1.6 转化苗的生根与移栽

将分化得到的幼苗移入生根壮苗培养基上培养, 待根系生长良好, 小苗长至 8~10 cm 时, 将其取出, 并将根部培养基清洗干净, 移栽于室外花盆中。

1.7 转化植株的分子生物学鉴定

转化苗取单株叶片约 2 g, 抽提植物总 DNA, 进行 PCR。

2 结果与分析

2.1 滤纸对共培养时愈伤组织的影响

农杆菌浸染后的愈伤组织接入共培养培养基上进行培养时,农杆菌往往大量增殖,以至覆盖整块愈伤组织,用水难以洗干净,农杆菌的过度生长和水洗对愈伤生长状态均有影响.本试验以MB液体培养基代替AAM液体培养基以及共培养时在共培养基上铺上1张灭菌滤纸,农杆菌大量增殖得到有效抑制.

2.2 干燥处理对抗性愈伤组织获得的影响

共培养后的愈伤组织经2~3 d的干燥处理,可以有效地杀死农杆菌,接入筛选培养基后没有农杆菌的生长,并且愈伤组织生长状态有所改善.本试验以TAC载体及pCAMBIA1300和LBA4404进行组合转化水稻愈伤组织时,对愈伤组织干燥处理和非干燥处理抗性愈伤获得率进行了对比(表1).结果表明,经干燥处理后,抗性愈伤组织平均获得率为4.3%,而不经干燥处理,抗性愈伤组织获得率仅为0.8%,说明干燥处理不仅可以有效杀死农杆菌,而且可以改善愈伤组织状态,提高转化率.

表1 干燥处理对抗性愈伤组织获得的影响¹⁾
Tab. 1 Effect No. of resistant calli with dessication treatment

品种 variety	外植体数 No. of explants	抗性愈伤组 织数 No. of resistant calli	转化率 frequency / %
培矮 64S Pei' ai64S	150	4(1)	2.7 (0.7)
农垦 58S Nongken58S	150	4(0)	2.7 (0.0)
7001S	210	5(1)	2.4(0.5)
中花 11 Zhonghua11	160	15(3)	9.4(1.9)

1) 括号中的数据为非干燥处理

2.3 预再生对愈伤组织再生能力的影响

胚性愈伤状态是愈伤组织再生的前提.愈伤组

织经过农杆菌浸染以及长时间的筛选和培养,再生能力下降.本研究将同一块抗性愈伤分裂增殖来的愈伤组织一部分进行预再生处理,一部分不进行预再生处理,比较其再生率(表2).结果表明,农垦 58S和培矮 64S 两个品种抗性愈伤组织经预再生和不经预再生区别不是很大,可能因为其新鲜抗性愈伤本来在预再生培养基上长出,已经得到预处理.而7001S 和中花 11 不经预再生时,抗性愈伤组织再生率分别为0和20%,而经过预再生后,再生率分别为78%和100%.说明预再生能提高愈伤组织绿苗再生率,从而提高转化率.

表2 预再生对愈伤组织再生的影响¹⁾
Tab. 2 Effect on regeneration of calli with pre-regeneration

品种 variety	愈伤组织 数 No. of calli	愈伤组织再 生数 No. of regeneration calli	再生率 frequency / %
培矮 64S Pei' ai64S	4	3(3)	75(75)
农垦 58S Nongken58S	11	11(9)	100(82)
7001S	9	7(0)	78(0)
中花 11 Zhonghua11	15	15(3)	100(20)

1) 括号中的数据为未预再生的结果

2.4 抗性愈伤组织及再生植株的获得

本实验对4个水稻品种的抗性愈伤率和阳性植株获得率进行了分析(表3).结果表明pCAMBI-A1300载体和农杆菌组合转化粳稻的转化率平均为5.6%,TAC载体和农杆菌组合转化粳稻的转化率则平均为1.4%,说明转化率与外源片段大小有关,外源片段小,转化率高;外源片段大,转化率相对较低.籼稻培矮 64S 虽然抗性愈伤组织获得率高,但阳性株系为0,粳稻农垦 58S 和7001S 的阳性株系分别为27和25,转化苗100%为阳性,说明粳稻转化效率明显高于籼稻.

表3 几个水稻品种转化获得的抗性愈伤组织和再生苗数
Tab. 3 No. of resistant calli and regenerated plants of several rice variety

品种 variety	载体 vector	感染愈伤数 No. of calli infected	抗性愈伤率 rate of resistant calli/ %	再生苗数 No. of regenerated plants	阳性株数 positive plants
培矮 64S Pei' ai64S	TAC	300	1.7	41	0
农垦 58S Nongken58S	TAC	300	1.3	27	27
7001S	TAC	420	1.4	25	25
中花 11 Zhonghua11	pCAMBIA1300	320	5.6	54	54

3 讨论

影响农杆菌转化水稻成功的主要因素有很多,包括水稻品种、外植体种类、农杆菌菌株和质粒载体、培养基组分、共培养时间、浸染方式等,凡是影响农杆菌Vir基因活化和愈伤组织生长和再生的因素

都可能影响到水稻的成功转化. 笔者以植物培养基 MB 作为农杆菌悬浮培养基, 在共培养基上铺上 1 张灭菌滤纸, 共培养时, 农杆菌在培养基及受体材料表面上不会过度生长, 共培养后干燥 2~3 d 再接入筛选培养基中, 这些处理可以抑制农杆菌生长, 而且可以改善愈伤组织状态, 提高转化率. 这与田文忠^[4]的研究结果一致.

抗性愈伤组织的再生是提高转化频率的关键. 抗性愈伤组织直接转入再生培养基中, 绿苗分化困难, 再生频率很低, 笔者将抗性愈伤组织转入预再生培养基培养 10~15 d 后, 愈伤组织变成坚硬、乳白色的胚性愈伤组织, 转入再生培养基后, 很快出现绿苗, 明显提高了分化频率, 从而也提高了转化率. 许多研究者认为预培养有利于植株再生^[5~7].

籼稻和粳稻是水稻栽培稻两个主要的亚种, 在遗传转化方面差异明显. 本研究使用的材料之一籼稻品种培矮 64S, 在抗性愈伤获得数上与其他 3 个粳稻品种相比无明显差异, 但最终未能获得真正的转化苗. 陈秀花等^[8]在籼稻和粳稻转化研究中发现, 两者的 GUS 瞬间表达率无明显差异, 但经筛选后, 籼稻的稳定转化率却相对较低. 籼稻和粳稻两个亚种间转化率的差异, 实际上是两者组织培养性能之间的差异. 籼稻胚性愈伤组织诱导系统较难建立, 细胞分裂能力弱, 转入选择培养基后愈伤组织生长缓慢, 不易分化成苗(另文发表). 因此提高籼稻的组织培

养特性和再生能力是非常关键的.

参考文献:

[1] HAMILTON C M, FRARY A, TANKSLEY S D, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 9 975—9 979.

[2] HIEI Y, OHTA S, TRIYAMA K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *India* rice[J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 727—730.

[3] HIEI Y, KOMARI T, KUBO T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Mol Bio, 1997, 35: 205—218.

[4] 田文忠, IANN R, ELUNIALAI S, 等. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994, 21(3): 215—218.

[5] YANG Y S, ZHANG Y D, CHANG P L, et al. Improvement of plant regeneration from long-term cultured callus of Taipei 309, a variety *in vitro* studies[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1999, 57: 199—206.

[6] TANG K X, ZHAO E P, HU Q N, et al. A simple and efficient procedure to improve plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell-suspension cultures of indica rice [J]. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*, 2000, 36(5): 362—365.

[7] 李一强, 范云六, 王金发. 籼粳杂交水稻 F1 种子胚愈伤组织诱导及再生体系建立[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 416—419.

[8] 陈秀花, 刘巧泉, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导转化籼稻影响因素的研究[J]. 江苏农业研究, 2001, 22(1): 1—6.

Optimization of the Conditions of *Agrobacterium*-Mediated Transformation in *Oryza sativa*

ZHOU Ling-yan, JIANG Da-gang, WU Hao, ZHUANG Chu-xiong
(College of Life Sciences, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Rice calli from mature embryos were transformed with *Agrobacterium* LBA4404 harboring plasmid TAC or pCambia1300, and the factors which influenced transformation were initially studied. The results showed that *Agrobacterium* wouldn't be overgrown when a piece of paper were placed on co-culture media. The transformation rate of *Japanica* is higher than that of *Indica*. *Agrobacterium* could be validly controlled by partial desiccation and the transformation efficiency could be increased greatly. Pre-regeneration could promote regeneration frequency and transformation efficiency.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); *Agrobacterium*; transformation

【责任编辑 柴 焰】