

郭涛, 沈任佳, 王加峰. 水稻基因遗传转化方法研究进展 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(6): 843-853.

GUO Tao, SHEN Renjia, WANG Jiafeng. Research progress on genetic transformation methods of rice[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(6): 843-853.



水稻基因遗传转化方法研究进展

郭涛[✉], 沈任佳, 王加峰

(华南农业大学 农学院/国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 介绍水稻遗传转化方法的发展历程和科研成果, 为水稻遗传转化体系的研究和应用提供借鉴。从生物介导转化法和非生物介导转化法 2 类方法出发, 介绍各种转化方法在水稻上的首次报道和重要进展并进行了展望。生物介导转化法中, 农杆菌 *Agrobacterium* 介导转化法通过侵染种胚、稻穗、愈伤组织和茎尖进行转化, 种胚及其诱导的愈伤组织作为材料的转化体系较为成熟, 稻穗和茎尖转化法则操作简便、转化再生周期短; 此外, 有研究尝试用根瘤菌 *Sinorhizobium* 和 *Rhizobium* 以及附着剑菌 *Ensifer adhaerens* 转化水稻。非生物介导转化法中, 物理方法转化法 (基因枪法、电击法、花粉管通道法和显微注射法) 是较为传统的转化方法, 基因枪法应用较为成熟, 花粉管通道法则取得较多育种成果; 介质介导转化法中, 纳米材料的应用正逐步成为研究热点。水稻遗传转化体系的发展可从转化材料的筛选和优化介导转化的载体入手, 同时将转化体系和 DNA-free、单倍体诱导等技术结合起来, 以提高转化效率和安全性, 缩短转化再生周期。

关键词: 水稻; 遗传转化; 农杆菌; 纳米材料

中图分类号: S511; S53

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)06-0843-11

Research progress on genetic transformation methods of rice

GUO Tao[✉], SHEN Renjia, WANG Jiafeng

(College of Agriculture, South China Agricultural University/National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To introduce the development process and achievements of rice genetic transformation methods, and provide references for the research and application of rice genetic transformation system. Based on the two methods of bio-mediated transformation and abiotic-mediated transformation, the first report and important progress of various transformation methods were introduced, with the prospect at last. Among the bio-mediated transformation methods, *Agrobacterium*-mediated transformation method is applied by infecting rice embryo, panicle, callus tissue and stem tip. The transformation system of seed embryo and its induced callus as materials is mature, and the transformation method using panicle and stem tip is simple and convenient, with short transformation and regeneration cycle. In addition, preliminary studies have tried to transform rice with *Sinorhizobium*, *Rhizobium* and *Ensifer adhaerens*. Among the abiotic-mediated transformation methods, physical method transformation methods (particle bombardment, electroporation, pollen-tube pathway and microinjection) are more traditional transformation methods. The particle bombardment method is relatively

收稿日期: 2023-07-01 网络首发时间: 2023-10-17 13:21:55

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20231016.0921.002>

作者简介: 郭涛, 研究员, 博士, 主要从事植物航天育种研究, E-mail: guoquot@scau.edu.cn

基金项目: 广东省普通高校创新团队项目“水稻航天生物育种创新团队”(2021KCXTD029)

mature, and the pollen-tube pathway method has made great progress in breeding. Among the medium-mediated transformation methods, the application of nanomaterials is gradually becoming a research hotspot. The development of rice genetic transformation can be initiated by selecting transformation materials and optimizing transformation vectors. Concurrently, integrating the transformation system with techniques like DNA-free and haploid induction can enhance both transformation efficiency and safety, while also reducing the duration of the transformation and regeneration process.

Key words: Rice; Genetic transformation; *Agrobacterium*; Nanomaterials

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,世界上超过一半人口以水稻为主食。据联合国粮农组织统计,全球水稻年产量超过 7 亿 t,我国是最大的水稻生产国,产量均占全世界产量的 30%^[1-2]。提高水稻产量、改善水稻品质,对保障我国乃至世界的粮食安全、提升人民饮食品质十分重要。

水稻产量的提升和品质的改进,可通过遗传转化技术实现。水稻遗传转化是指通过生物体(多为病原菌)或具有生物相容性材料的介导,将外源 DNA、RNA、蛋白质或其复合体等生物大分子导入水稻体内,进行基因功能研究或者改良水稻生物性状的一项技术。作为一种重要的单子叶模式植物,水稻基因组大小仅为 420~466 Mb,由约 4 亿个碱基对构成,正常情况下栽培稻为二倍体,适宜进行遗传转化研究^[3-4]。水稻遗传转化技术在基因功能验证、信号通路转导研究、农艺性状改良及优良种质选育、生物产品的生产上均发挥着十分重要的作用^[5-7]。

本文将从生物介导转化法和非生物介导转化法 2 类方法出发,对水稻遗传转化的研究进展进行综述,重点介绍各种转化方法在水稻上的首次报道和重要进展,最后结合 2 类介导转化方法的特点和在建立转化体系中发展起来的 DNA-free 技术,对水稻遗传转化方法进行展望。

1 生物介导转化法

1.1 农杆菌介导转化法

农杆菌 *Agrobacterium* 是目前水稻介导遗传转化最常用的生物,主要包括根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 和发根农杆菌 *A. rhizogenes*。自然条件下,农杆菌具有将自身基因转入植物体内的能力:植物受伤后分泌的酚类物质,吸引农杆菌趋化性感染伤口并进入植物体内,之后农杆菌裂解释放 Ti 质粒,质粒中 T-DNA 插入植物细胞基因组并表达,合成破坏植物细胞分裂调控系统的冠瘿碱类物质,诱发细胞癌变分裂进而形成冠瘿碱瘤。由于 Ti 质粒毒性区有负责转移 T-DNA 的基因,即使毒性区与

T-DNA 处于不同 DNA 片段,仍可协助 T-DNA 转移,因此科学家通过设计包含选择标记基因、待转化基因的 T-DNA 区,形成小载体,与 Ti 质粒形成共转化的双元质粒系统,用于将外源基因引入水稻体内^[8]。

农杆菌介导转化体系具有外源基因转移效率高、拷贝量低、沉默率低、便于通过标记基因检测以及可转化长片段 T-DNA (> 150 kb) 的优点,广泛应用于植物遗传转化,并在植物生理分子机理验证、作物农艺性状改良、生产生物产品等方面发挥巨大作用^[9]。然而,由于单子叶植物的细胞壁伸展蛋白和分生细胞的结构特点,其不容易受农杆菌侵染,导致农杆菌转化体系的建立十分困难^[10-11]。作为典型的单子叶植物,水稻在早期研究中通过农杆菌转化再生较为困难,如转化粳稻成熟胚仅能获得插入外源基因的愈伤组织,而未获得再生植株^[12]。

为建立高效稳定的水稻农杆菌介导转化体系,研究者以种胚、稻穗、茎尖和愈伤组织等器官组织为转化材料,建立了适宜不同类型、品种水稻转化的试验体系。

1.1.1 种胚转化 在早期研究中,水稻的种胚,包括成熟胚、未熟胚和盾片,是转化率较高的材料^[8]。作为转化材料,种胚具有易获取、无需诱导、再生时间短的优点,但目前在籼稻的遗传转化上需进一步提高转化效率。

1990 年,水稻首次实现农杆菌介导的种胚转化,打破了只能通过原生质体转化的材料限制。通过原位杂交、GUS 活性检测技术,Raineri 等^[12] 确认获得有 GUS 活性的成熟胚分生愈伤组织,但因接种后粳稻‘富士光’和‘日本晴’的胚褐化硬化,或者只分化根不分化茎,因而未能获得再生植株。考虑到未熟胚再生能力强,粳稻‘Tainung62’的未熟胚被用于转化,同时通过改进共培养基、用不同启动子调控不同基因过表达,Chan 等^[13] 获得了基因在各部位均过表达的 R₀ 代转化再生单株,并且 R₁ 和 R₂ 代在维持外源基因过表达的同时保持正常

生长和结实,这表明种胚转化法具有获得稳定遗传株系的潜力,但存在转化效率低的问题,不适宜大规模应用。随后,研究者通过开发“超级双元”载体系统提高转化效率:EHA101菌株(piG121Hm质粒)体系成功转化顽拗型粳稻‘Tsukinohikari’,未熟胚筛选3周后的转化效率可达6%^[14];LBA4404菌株(pTOK233质粒)体系更是成功转化籼稻的未熟胚(品种为‘IR72’和‘TCS10’),转化效率达1%~5%^[15]。

为进一步提高转化再生效率,可使用再生能力强的盾片组织。农杆菌对水稻种子的早期感染能够增强后期愈伤组织的选择效率,Toki等^[16]通过预培养成熟种子1d后再取盾片进行转化,在1个月内便成功获得再生转基因植株,既缩短了离体组培的周期、减少了细胞在脱分化状态长期组培的体细胞变异,又可避免直接转化盾片导致的效率低下问题。

1.1.2 稻穗转化 1998年,农杆菌浸花法首次在拟南芥中实现外源基因转化^[17]。操作简便的浸花法使得拟南芥成为应用最广泛的遗传转化模式植物。水稻作为自交结实的结穗作物,和拟南芥有相似的结构特征,能否通过浸花法实现高效遗传转化,引起了研究者的关注。

为避免漫长的组培再生过程,研究者将泰国水稻‘RD41’小穗去顶后,在转化*gusA*的农杆菌AGL1悬浮液中浸泡1min,25℃条件下套袋3d后进行GUS分析和镜检。各花器平均转化率为12.73%,子房仅7.23%,花药最高,可达89.16%,且大部分阳性花药中的花粉有GUS活性。这与拟南芥中雄性生殖系(花粉)转化率低、雌性生殖系(子房)转化率高的现象相反,表明水稻中花药、花粉有更大的转化潜力,同时直接浸穗即可转化花粉^[18]。随后,该团队深入检测转化效率,并尝试滴花法:将转化*gusA*的农杆菌菌株AGL1和EHA105在悬浮培养液中培养至 $D_{600\text{nm}}$ 为0.8~1.0后,在标准接种培养基重悬浮培养获得活化菌液,将穗浸入菌液1min(浸花法)或将菌液置于去顶小穗中(滴花法),共培养2d。浸花法中EHA105菌株转化效果较好,结合PCR检测和GUS分析,*gusA*阳性率为1.05%(3/286),与其他作物1.5%~3.0%的水平接近;滴花法瞬时转化效率高,但花在2d内褐化死亡,说明该法不适用于水稻转化^[19]。

有研究以黑米为材料,比较以愈伤组织为材料的离体转化法和以稻穗为材料的活体转化法,发现离体转化法的转化效率为活体转化法的5倍(1.51%/0.31%),但活体转化法因不需要经历组培

阶段,用时30d即可鉴定阳性株系。通过离体转化法,该研究获得了T₁代表型正常、早花3周的转基因黑米^[20]。

水稻浸花转化法操作简便、成本低,同时,由于不需要经历组培阶段,也避免了组培中材料污染从而影响植株正常生长的风险。但其转化效率低,没有特定的转化靶标位点,同时需要在花期用稻穗进行转化,有一定的时间限制,因此目前在水稻上尚未大规模应用^[19-20]。

1.1.3 愈伤组织转化 愈伤组织处于代谢旺盛的脱分化状态,易于诱导产生胚状体,是进行遗传转化和植株再生较为理想的材料^[21]。盾片是水稻种胚的组成部分,保护胚芽并为其提供养分。盾片胚性愈伤组织能再生出茎原基和根原基,具有离体再生频率高、周期短、再生植株育性好的优点,是水稻中常用于转化的愈伤组织类型^[22-23];但与种胚转化法相比,需要切取盾片并经历愈伤组织诱导及再生过程,人工和时间成本有所增加。

早期研究中,粳稻盾片胚性愈伤转化阳性率可达23%,而直接转化盾片的仅为9%,同时盾片胚性愈伤组织共培养即时转化效率达93%,远超根源愈伤组织的21%^[14]。顽拗型籼稻‘Basmati’的盾片胚性愈伤转化效率也高达22%,接近粳稻和双子叶植物,并且R₁代形态和育性正常^[24]。在确认盾片胚性愈伤组织的转化能力后,研究者通过改进愈伤组织再生体系,如探索诱导转化物的浓度、愈伤组织诱导生长时长、培养基碳源种类和激素用量等,提高转化再生率,籼稻‘IR64’转化后的筛选再生率可达6.94%^[25-26]。

1.1.4 茎尖转化 茎尖是植物中较早用于快速无性繁殖的部位^[27]。茎尖来自已分化的器官,与愈伤诱导系相比,变异更少,符合遗传转化的要求^[28];同时有较强的分生能力,借助组培体系能快速扩繁,快捷省时^[29-30]。

茎尖转化法首先在矮牵牛*Petunia*和玉米*Zea mays*上得以实现,通过茎尖与农杆菌的共培养,成功获得阳性转化体^[30-31]。1994年,Hiei等^[14]对粳稻‘Tsukinohikari’进行2次转化,共培养即时转化率高达90%,但经筛选培养后未能成功。随后,通过在茎尖分生组织区制造伤口后进行共培养,*bar*基因成功转化至粳稻‘Maybelle’中,转化株系的抗除草剂表型一直遗传至R₂代,但R₂代的分离不遵守孟德尔定律^[32]。

籼稻茎尖转化体系发展较慢,该体系首先在少数籼稻品种中建立,稳定转化效率为5.6%~8.0%^[33]。

通过调节添加的激素及浓度, 该体系适用性大大拓宽, 能够实现 ‘IR64’ 等 8 种籼稻的高效再生, GUS 基因转化率 (共培养 3 d 后) 高达 80%~100%^[34]。

1.2 农杆菌以外的生物介导转化法

由于农杆菌介导转化法在籼稻中转化率不高、在非科研应用领域存在专利限制, 科学家开始关注农杆菌以外的生物介导转化法。研究发现, 根瘤菌 *Sinorhizobium*、*Rhizobium* 和附着剑菌 *Ensifer adhaerens* 可通过转入合适的双元载体后侵染转化植物^[35-36]。

1.2.1 根瘤菌 由于亲缘关系较近, 具有诱导植物冠瘿潜力的苜蓿中华根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* 首先被用于转化水稻^[37]。该菌导入去毒 Ti 质粒 pTiWB3 和双元载体 pCAMBIA1405.1 后, 转化水稻种子胚性愈伤组织, GUS 活性率为 0.6%(4/687) 且仅获得单个再生苗的株系; 对照的农杆菌转化试验, 50%~80% 的愈伤组织检测到 GUS 活性, 20% 愈伤组织再生成株^[38]。Rahmawati 等^[39] 也发现 *S. meliloti* 转化效率为 0~1%, 但根瘤菌 *Rhizobium leguminosarum* 转化粳稻和籼稻, GUS 瞬时表达率均比农杆菌高。这些研究表明, 适宜水稻转化的菌种具有特异性, 可能有其他转化效率更高的菌种。

1.2.2 附着剑菌 附着剑菌 *E. adhaerens* (OV14) 在分类上更接近根瘤菌属 *Rhizobium*, 生物安全性更高^[40]。在筛选病菌替代农杆菌介导转化植物的研究中, 附着剑菌对土豆的转化率高达 35.1%, 具有转化经济作物的潜力, 有利于打破农杆菌介导技术应用的专利限制^[41]。比较 OV14 和农杆菌 EHA105 对粳稻 *gus* 基因的转化效率发现, OV14 转化 ‘Nipponbare’ 的阳性率 (7.2%) 高于 EHA105(4%), 而 EHA105 转化 ‘Curinga’ 的阳性率 (32%) 高于 OV14(16%), 显示出 2 种菌株转化粳稻的品种特异性; OV14 能够实现顽拗籼稻 ‘IR64’ 的转化, 侵染率高达 90%, 但阳性率仅约 1%。外源基因通过 OV14 插入水稻基因组的模式与农杆菌类似, 为随机插入, 同时均可插入外显子^[42], 但具体机理仍有待进一步研究。

2 非生物介导转化法

2.1 物理方法

物理方法是指通过轰击、电击和注射等物理手段将外源基因转化至水稻体内的转化方法, 具有非基因型依赖、转化直接的优点, 但在转化过程中容易出现因外力或电击作用导致的 DNA 片段破裂和非目的基因片段的插入, 从而影响转化效果。报道

较多的物理转化法主要有基因枪法、电击法、花粉管道法和显微注射法。

2.1.1 基因枪法 基因枪法利用压缩空气, 将粘有外源基因 DNA 的金粉颗粒打入细胞进行遗传转化。不需要经历 “病原菌-植物体” 互作的识别过程, 基因枪法能够有效解决水稻农杆菌介导转化存在的基因型依赖、操作繁琐等问题, 并且一次可转化大量细胞^[43]。然而, 基因枪法对细胞造成损害较大, 不利于后期的分化再生, 而且整合过程中易发生重排, 不利于基因稳定遗传^[44-46]。

基因枪法可转化的材料包括种胚、愈伤组织和叶绿体, 转化首先在种胚上实现。为提高水稻除草剂抗性, 在通过 *gus* 基因转化确认基因枪法转化水稻的可行性后, 除草剂抗性基因 *bar* 成功导入美国重要商业品种 ‘Glufont’ 和籼稻 ‘IR54’ 等多个品种的未熟胚, R₁ 代性状分离符合孟德尔分离定律^[47]。进一步的田间试验发现, 对具有抗除草剂性状 ‘Glufont’ 和 ‘IR54’ 转化系叶施草铵膦, 植株的正常生长未受影响, 但四叶期野生型对照植株在施药 7 d 内死亡, 表明基因枪法转化得到的水稻植株具有商用潜力^[48]。

获取种胚需要耗费大量劳力, 研究者尝试用愈伤组织进行高效转化再生, 3~4 周龄愈伤组织在转化后 6~8 周即可获得再生株系^[49]。种胚诱导再生的愈伤组织具有较强分化能力, 籼稻 ‘TN1’ 上建立的体系 *gus* 基因转化后植株再生率为 2%~4%, 粳稻 ‘Taipei309’ 胚性愈伤组织的悬浮细胞通过转化 *bar* 基因也获得草丁膦抗性^[50-51]。后续研究通过改进 ‘Taipei309’ 的胚原愈伤组织培体系, 可实现携带 2 种基因的不同质粒的共转, 并可通过 *Cre-lox* 介导的位点特异整合重组酶系统精准插入 *npt* 和 *gus* 基因, 大大提升转化效率和精准性^[51-52]。

叶绿体作为水稻中负责光合作用的细胞器, 在外源基因遗传转化上有独特的优势。叶绿体基因遗传模式为母系遗传, 转入叶绿体的基因不会通过花粉扩散到其他植物中, 转化安全性高; 同时转化基因表达量高、转化效果好^[29, 53]。虽然存在高效选择标记基因较少、转化后翻译产物难以检测和转化后代遗传不稳定等缺点, 但仍应用于提高品种抗性、生产生物产品方面^[29, 54-55]。叶绿体转化法在水稻中的转化对象多为叶绿体发育前体——前质体, 目前已成功实现转化和植株再生, 但总体转化效率仍有待提高。该法首先实现荧光蛋白 *sGFP* 基因的转化并获得形态和育性正常的植株^[55]; 为提高转化效率, 水稻叶绿体双顺反子位点特异性整合表达载体

的元素被引入专门设计的载体 pCTE04 上, *eGFP* 基因通过该载体转入盐生杜氏藻, 可直接观测到强烈荧光, 表明该转化体系的可行性^[53]; 基因枪法将具有 TALEN 编辑功能的 pCE4-IALR 和 pCTE04 载体共转水稻愈伤组织, 转化效率为 0.35%, 是单独转化 pCTE04 的 2 倍^[56]。

2.1.2 电击法 高压电脉冲击穿细胞膜形成瞬间通道, 进而促进外源 DNA 摄取的电击法, 具有简便易行、适用物种广泛、可转化材料类型较多和转化效率高等优点^[57], 但直接暴露在电解液中的待转化 DNA 在电击过程中易受损, 影响转化效率^[58]。

首次电击转化在水稻原生质体进行, 成功获得转化抗生素类标记基因——氯霉素乙酰转移酶基因, 同时该研究发现避免电极直接接触水稻原生质体的间接转化法操作快捷、污染较少且能保持原生质体活性^[59]。后续试验改进原生质体再生体系, 成功转化氨基糖苷磷酸转移酶基因至原生质体并获得再生植株^[60]。转化原生质体存在材料易损伤, 经历愈伤再生阶段时易发生多余的基因修饰等问题^[43,61]。De Pádua 等^[62] 使用稻稃茎尖进行转化, 不仅成功建立阳性率高达 13.8% 的转化体系, 且可遗传至 R₂ 代。考虑到未熟胚再生活性较强, Ren 等^[63] 改进电击体系, 用 10 d 龄未熟胚在 0 °C 进行电击转化, 胚存活率超过 95%, 并成功转化金属硫蛋白基因 *OsMT2bL* 和 *gus* 基因。

2.1.3 花粉管通道法 向授粉子房注射含外源基因的溶液, 进而形成花粉管转化受精卵的花粉管通道法, 由我国科学家提出^[64]; 同时期花色变异矮牵牛的创制, 直接证明了该法的可行性^[65]。该法转化水稻, 具有不依赖组培、操作快捷省时的优点, 而且相比传统育种方法, 仅需 3~4 个世代即可固定性状, 但也存在高世代分离比例大、外源 DNA 易丢失以及重复性差等缺点^[29,66]。

我国较早利用花粉管通道法进行水稻遗传改良, 1985 年获得具有紫色颖壳性状的水稻, 在各株系中占比 72.7%, 显示出花粉管通道法在水稻育种上的应用潜力^[67]。Luo 等^[68] 从分子水平上验证了该法的可行性, 转化报告基因 *nptII* 的水稻小花结实率达 20%, 总体转化效率达 4%, 高于显微注射法。

花粉管通道法在水稻育种上应用近 40 年, 目前在多个性状上已培育出表现突出的品系或品种。在早熟稻方面, 转化多种植物混合 DNA 的 ‘垦 D01-1381’ 在 2002 年黑龙江省第二积温带早熟组预备试验中较对照增产 12.05%, 排名第 2, 并作为亲本培育出适合黑龙江垦区早育稀植的 ‘垦稻

26’ (垦 02-55×垦 94-1043/垦 D01-1381, 2014 年审定)^[69]; 在晚熟稻方面, 稗子 DNA 导入 ‘湘晚粳 5 号’ 获得的晚粳品系 ‘HK7’, 在优质稻品比试验 (晚粳常规稻组) 中平均产量为 6787.5 kg/hm², 组内排名第 1, 食口性好^[70]; 在抗性方面, 培育出抗除草剂品系 ‘E32’ 和抗稻瘟病品系 ‘HK119’, 其中 ‘HK119’ 产量优异, 且保持原受体优良米质^[70-71]。

2.1.4 显微注射法 利用玻璃微量注射器, 将外源基因 DNA 直接注入单细胞或组织的显微注射法, 通常转化子房、原生质体和种胚等再生能力强的材料。该法可将核酸、蛋白质和人造物等多种物质同时注入同一细胞, 实现多种介质的高效转化; 然而, 由于转化在细胞层面进行, 对操作设备、技术要求高, 转化前后相关工作繁琐^[72]。

未授粉子房形成的愈伤组织可发育为单倍体植株, 罗忠训等^[73-74] 通过显微注射法将玉米醇溶蛋白基因注入水稻 ‘景洪 2 号’ 未受精子房并诱导获得单倍体植株, 虽然子房形成的愈伤组织阳性转化率达 20%, 但子房形成再生植株几率仅为 0.2%。相比于子房, 原生质体转化成功率高, 人工和机器转化 *eGFP* 基因成功率均达 7%~8%, 但机器自动化操作效率比人工快 17 倍, 显示出该方法自动化应用、高效转化的潜力^[72]; 此外, 卵细胞和受精卵转化 *GFP* 基因也获得成功, 转化后生存率较高^[75]。由于只依靠物理操作进行转化效率较低, Baskaran 等^[76] 往水稻种胚茎尖分生组织区注射携带 *gus* 基因的农杆菌液, 转化效率高达 40%, 表明将生物和物理介导转化法结合有助于提高转化效率。

水稻方面显微注射转化法研究较少, 且多集中于体系的建立, 聚焦于转化材料、高效转化操作的探索, 功能基因的转化及相关性状的遗传改良方面成果有限, 这可能与该方法技术难度大有关。

2.2 介质材料介导

为减少物理方法转化法在转化过程中对 DNA 片段造成的损伤, 科学家利用纳米材料、聚乙二醇 (PEG)、脂质体和藻酸钙微珠等材料介导转化外源 DNA 片段。其中, 纳米材料因具有多样的物理特性和较好的生物相容性, 逐渐在水稻遗传转化中受到青睐。

2.2.1 纳米材料 纳米材料是指颗粒尺寸为 1~100 nm 的材料, 因其尺寸微小而具有不同于传统宏观材料的力学、电学和磁学特性。纳米材料载体可以通过包裹、静电作用、化学偶联等方式吸附和压缩 DNA, 形成纳米载体基因复合物, 透过细胞壁转化至细胞中。

非金属材料方面,碳化硅晶须 (Silicon carbide whisker, SCW) 是最早应用于水稻转化的纳米材料,其颗粒硬度大、边缘锋利,在与细胞搅拌过程中可穿透细胞,进而转化混合液中的外源基因片段^[77]。通过混合水稻细胞、SCW 和携带 *gus* 基因质粒, *gus* 基因成功得到转化,每克细胞中有 533 个发光细胞^[78];而与超声处理结合,可进一步提高细胞悬浮液的转化效率^[79]。虽然碳化硅晶须介导法具备操作便捷、成本低、待转化 DNA 纯度要求低的优点,但 SCW 作为一种致癌物,安全性不容忽视,因此研究者尝试用硼酸铝替代 SCW,最终成功转化种胚性愈伤组织^[29, 78, 80]。碳量子点 (Carbon dots, CDs) 是另一种在水稻遗传转化上有应用潜力的非金属纳米材料,由尺寸小于 10 nm 的碳纳米颗粒组成,具有毒性低、水溶性良好及生物相容性等优点^[81]。研究发现,CDs 表面引入聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI) 形成的带正电的纳米复合物 CDP,吸附 DNA 的同时保护其免受 DNA 酶降解,进而实现水稻高效遗传转化和蛋白质表达,目前已成功转化 β -葡萄糖醛酸酶基因至成熟胚诱导的愈伤组织中^[82]。

金属纳米颗粒在转化过程中对外源基因 DNA 起保护作用。传统金颗粒尺寸可达 4 μm ,DNA 被包裹在颗粒外围,轰击时易造成 DNA 损伤;而尺寸不足 1 μm 的金纳米颗粒则吸附在 DNA 外围,轰击时能保护 DNA。将金纳米颗粒与分别携带毒蛋白基因 *cry IA (c)*、标记基因 *hph* 的 2 种质粒混合,共转水稻愈伤组织,再生植株中分离得到无标记基因成分的可育阳性植株,证明金纳米颗粒与基因枪法、质粒共转相结合获得 DNA-free 转基因水稻的可行性^[83]。类似地,磁性纳米粒子 (Magnetic nanoparticles, MNPs) 在电击法转化 *GFP* 基因的过程中包裹并保护 DNA,与传统电击法相比转化效果大大提升,克服了电击法损伤 DNA 的缺点^[58];MNPs 对 DNA 的保护作用在另一种基因编辑载体 pRGE32 上也得到了证明,并成功介导了香味基因 *fgr* 在‘日本晴’中的基因编辑^[84-85]。

2.2.2 其他介质 聚乙二醇 (PEG)、脂质体和藻酸钙微珠因具有生物亲和性,也可作为介质介导水稻的遗传转化。由于总体转化效率不高、转化材料一般为制备繁琐的原生质体,这些材料目前应用较少,更多的是作为补充途径。

PEG 介导转化法是水早最早的遗传转化方法。PEG 与多种有机物组分有良好的相溶性,可引起细胞膜表面电荷紊乱,干扰细胞膜识别功能,进而促进细胞吸收外源 DNA;然而该法需要转化原生质

体,存在去壁流程繁琐、再生缓慢和转化效率低的缺点^[78]。PEG 介导的水稻原生质体转化再生体系,基于原生质体的体细胞胚胎发生建立,与 PEG 浓度和原生质体密度密切相关^[86-87]。基于该体系,水稻原生质体成功转化氨基糖苷磷酸转移酶基因、 β -葡萄糖醛酸酶基因和 *gus* 基因,并再生得到阳性植株,转化率达 2%~3%^[88-90]。

脂质体介导转化法也较早应用于水稻转化。脂质体是由磷脂和胆固醇等组成的双分子膜结构体,将外源 DNA 包裹其中形成的复合体,可通过细胞膜融合和内吞作用转化至细胞中,若结合转化原理类似的 PEG 共同转化原生质体,可进一步提高转化效率^[91]。脂质体首次介导转化水稻原生质体的研究中,原生质体再生的愈伤组织转化率达 14%^[92];基于该体系,人体免疫反应重要糖蛋白 α -干扰素基因成功转入水稻原生质体并获得转基因植株,转化率为 10.4%,显示出脂质体介导创制功能型水稻的潜力^[93]。

作为一种亲水类多聚糖,藻酸钙在 Ca^{2+} 存在条件下,凝固成可吸附大片段 DNA 的生物活性微珠,具有较高的生物安全性。藻酸钙微珠可转化各种长度的 DNA 片段,小可转化 4.1 kb 的 pUC18-sGFP 至水稻原生质体,大可转化 124 kb 的酵母人工染色体 (YAC) 至酵母中,具有广泛的转化适用性^[94-95]。然而,传统人工操作转化 *GFP* 基因至水稻原生质体成功率极低 (< 0.1%),为此, Wada 等^[96] 从改进藻酸钙微珠形态入手,利用声波发生器和微型注射器组成的简单装置生产尺寸更小、更均匀的微珠,以提高转化效率。

3 总结与展望

3.1 优化转化材料和改造农杆菌提高水稻遗传转化效果

生物介导转化法中,农杆菌介导转化法因转化效率高、体系成熟稳定应用较广。目前农杆菌介导转化的材料主要有种胚、稻穗、茎尖和愈伤组织 (多从种胚诱导得到)。种胚及其愈伤组织转化体系较为成熟,但再生体系具有高度的基因型依赖性,需经历漫长的愈伤再生周期 (2~3 个月),并且需要探索适应不同品种水稻的培养基组分、培养环境和时间,品种间转化效果差异较大^[9];稻穗和茎尖转化法则由于再生无需经历愈伤阶段、转化周期较短 (约 1 个月),同时转化体系的建立不依赖品种基因型,在品种繁多、品种间差异较大的水稻转化方面具有更广阔的应用前景^[20, 97]。稻穗和茎尖转化法分别转化的是生殖器官和营养器官,2 种方法可以取长补短

短、互补使用。稻穗转化法具有操作便捷的优点,但本质上为稻穗的活体转化,只能在水稻生殖生长期进行,时间较为受限,以广州一年2季的种植模式为例,早造需在5—6月转化,晚造需在9—10月转化;茎尖转化法的材料主要来源于种子诱导4 d后得到的茎尖分生组织,由于种子可低成本长期贮存、茎尖可快速诱导,因此茎尖转化可随时进行,但后代植株仍存在体细胞嵌合问题,获得稳定遗传的转化株系周期较长^[29, 32]。因此,水稻生殖生长期可进行稻穗转化,目前多在抽穗期伊始取穗转化^[18-20],同时也可考虑在抽穗前1~2 d的花粉完成期(三核花粉期)进行转化以加快进度,此时花粉发育全部完成,符合转化要求^[98];而在营养生长期,则可诱导种子长出茎尖分生组织进行转化。

除了合适的转化材料,改造介导转化的菌种也是提高转化效果的另一个方面。单子叶植物细胞壁的结构特点,加上农杆菌的T4SS分泌系统触发了植物PTI(PAMP-triggered immunity)反应,导致农杆菌难以高效地转化单子叶植物^[11, 99];而革兰阴性细菌针状结构的T3SS分泌系统,有助于阻断植物PTI反应,使细菌在宿主内生长繁殖,这在水稻、小麦和大麦等单子叶植物中均有报道^[100-101]。科学家利用T3SS分泌系统对农杆菌进行改造,使农杆菌抑制植物PTI反应的同时正常整合外源基因,单子叶植物柳枝稷转化效率提高近4倍^[102]。因此,后续研究可以整合T3SS分泌系统和包含水稻特异性Ti质粒的农杆菌,提高转化效率。

3.2 纳米材料介导转化法有望成为水稻非生物介导转化发展的方向

非生物介导转化法主要有物理方法和介质材料介导转化法。由于不涉及“病原体-植物”识别过程,非生物介导转化法不存在基因依赖性,可转化的水稻品种广泛;但物理方法转化容易造成细胞和外源DNA的损伤,而以PEG、脂质体和藻酸钙微珠为代表的传统介质材料,则需要转化获取困难的原生质体。作为一种新兴材料,纳米材料在水稻转化的研究中越来越体现出生物相容性、友好性和广适性。从早期通过SCW刺伤细胞促进其吸收溶液中的外源DNA,到金纳米颗粒包裹外源DNA轰击愈伤组织,到现在通过MNPs携带并保护外源DNA、在磁场下转化花粉,纳米材料介导转化的过程中越来越重视对外源DNA和转化细胞的保护,这有利于提升转化再生效果、减少非目的基因片段的插入^[77, 83-84]。

随着CRISPR-Cas9技术的发展,纳米材料介导

转化CRISPR载体有望成为未来水稻遗传转化的发展方向。由于CRISPR/Cas9技术仅编辑水稻自身基因、不引入其他物种基因,可实现无外源DNA片段残留的基因编辑^[103],CRISPR体系在水稻遗传转化应用的安全性较高;同时,纳米材料能高效负载和保护CRISPR载体,形成压缩复合体,有利于细胞通过吞噬作用吸收外源DNA^[85, 104],因此,利用纳米材料携带CRISPR载体在转化水稻上具有一定应用潜力,目前已实现MNPs介导香味基因*fgr*在‘日本晴’中的编辑^[84]。若能结合花粉培养技术,转化水稻小孢子诱导的愈伤组织再生得到单倍体植株,并进行染色体加倍,则可快速得到纯合二倍体植株,该技术已在大麦上应用^[105]。

3.3 应用DNA-free和单倍体诱导技术实现水稻安全高效的转化和育种

DNA-free技术是一种不引入目的基因以外DNA片段或完全不引入外源基因的遗传转化技术,由于在转化过程中不引入来自农杆菌的外源DNA,转化作物在商业化应用中受到的监管及限制较少^[106],可大大拓宽其商业化应用前景。早期水稻通过共转分别携带目的基因、标记基因2种载体,在发生分离的后代中选择仅含有目的基因的株系实现DNA-free^[107-108]。后续研究通过电转CRISPR质粒或Cas9-gRNA核糖核蛋白(RNPs)至合子中,实现无外源DNA残留的基因编辑^[103],应用无需供体DNA插入的基因组编辑技术甚至可实现911 kb的大片段插入,以创制抗除草剂株系^[109]。

然而,对每个基因分别进行编辑和纯合株系筛选仍费时费工,若能应用单倍体诱导技术实现规模化编辑,则可大大提高育种效率。目前,水稻建立了基于*BBM4*卵细胞异位表达和*MiMe*突变的高结实率无融合生殖体系,母本可通过孤雌生殖产生单倍体(Double haploid, DH)种子^[110-111]。水稻为雌雄蕊同花的自花授粉作物,通过浸穗转化可同时转化雄蕊和雌蕊^[18],因此可参考玉米将具有编辑特定基因功能的单倍体诱导系(Haploid induction, HI)父本与优良母本杂交、获得特定基因编辑的纯合后代株系的方法^[112],通过稻穗转化法,快速引入CRISPR系统至水稻HI的花蕊中编辑特定基因,再通过无融合生殖获得纯合DH后代,实现水稻高效、规模化的分子育种。

参考文献:

- [1] 张琴. 杂交水稻种业“走出去”的成功探索与发展趋势[J]. 中国稻米, 2021, 27(4): 104-106.
- [2] 焦悦, 黄清, 费小吉, 等. 国外稻谷生产加工现状[J]. 粮

- 油食品科技, 2022, 30(2): 68-76.
- [3] GOFF S A, RICKE D, LAN T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica)[J]. *Science*, 2002, 296(5565): 92-100.
- [4] YU J, HU S N, WANG J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica)[J]. *Science*, 2002, 296(5565): 79-92.
- [5] BAJAJ S, MOHANTY A. Recent advances in rice biotechnology: Towards genetically superior transgenic rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3(3): 275-307.
- [6] LUO L, XIE Y, YU S, et al. The DnaJ domain-containing heat-shock protein NAL11 determines plant architecture by mediating gibberellin homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *The New Phytologist*, 2023, 237(6): 2163-2179.
- [7] WAKASA Y, TAKAGI H, HIROSE S, et al. Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2013, 11(1): 66-76.
- [8] HIEI Y, KOMARI T, KUBO T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(1): 205-218.
- [9] MOHAMMED S, SAMAD A A, RAHMAT Z. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice: Constraints and possible solutions[J]. *Rice Science*, 2019, 26(3): 133-146.
- [10] POTRYKUS I. Gene transfer to cereals: An assessment[J]. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7(10): 269-273.
- [11] SOOD P, BHATTACHARYA A, SOOD A. Problems and possibilities of monocot transformation[J]. *Biología Plantarum*, 2011, 55(1): 1-15.
- [12] RAINERI D M, BOTTINO P, GORDON M P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Nature Biotechnology*, 1990, 8(1): 33-38.
- [13] CHAN M T, CHANG H H, HO S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 22(3): 491-506.
- [14] 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[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2): 271-282.
- [15] ALDEMITA R R, HODGES T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties[J]. *Planta*, 1996, 199(4): 612-617.
- [16] TOKI S, HARA N, ONO K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(6): 969-976.
- [17] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [18] ROD-IN W, SUJIPULI K, RATANASUT K. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation[J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2014, 10(2): 467-474.
- [19] RATANASUT K, ROD-IN W, SUJIPULI K. *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of rice[J]. *Rice Science*, 2017, 24(3): 181-186.
- [20] SUSANTO F A, WIJAYANTI P, FAUZIA A N, et al. Establishment of a plant tissue culture system and genetic transformation for agronomic improvement of Indonesian black rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2020, 141(3): 605-617.
- [21] 王蒂, 陈劲枫. 植物组织培养 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2013: 64.
- [22] 伍成祥, 宛煜嵩, 徐俊, 等. 水稻成熟胚盾片诱导愈伤组织再生体系的建立[J]. *热带作物学报*, 2002, 23(3): 88-95.
- [23] JONES T J, ROST T L. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) *Scutellum* epithelial cells[J]. *Botanical Gazette*, 1989, 150(1): 41-49.
- [24] RASHID H, YOKOI S, TORIYAMA K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(10): 727-730.
- [25] TRIPATHI R M, BISHT H S, SINGH R P. Effect of acetosyringone and callus age on transformation for scutellum-derived callus of rice[J]. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2010, 1(4): 163-171.
- [26] TRAN T N, SANAN-MISHRA N. Effect of antibiotics on callus regeneration during transformation of IR 64 rice[J]. *Biotechnology Reports*, 2015, 7: 143-149.
- [27] MOREL G M. Morphogenesis of stem apical meristem cultivated *in vitro*: Application to clonal propagation[J]. *Phytomorphology*, 1972, 22: 265-277.
- [28] RATNAYAKA I J S. *Agrobacterium* mediated gene transformation of rice: Comparison of callus and shoot apex derived plants[D]. College Station, Texas: Texas A&M University, 1999.
- [29] 李君, 李岩, 刘德虎. 植物遗传转化的替代方法及研究进展[J]. *生物技术通报*, 2011(7): 31-36.
- [30] ULIAN E C, SMITH R H, GOULD J H, et al. Transformation of plants via the shoot apex[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1988, 24(9): 951-954.
- [31] GOULD J H, DEVEY M E, HASEGAWA O, et al. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex[J]. *Plant Physiology*, 1991, 95(2): 426-434.
- [32] PARK S H, PINSON S R M, SMITH R H. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(6): 1135-1148.
- [33] AROCKIASAMY S, IGNACIMUTHU S. Regeneration of transgenic plants from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants[J]. *Plant*

- [Cell Reports](#), 2007, 26(10): 1745-1753.
- [34] DEY M, BAKSHI S, GALIBA G, et al. Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in rice (*Oryza sativa* spp. *indica*) using TDZ[J]. *3 Biotech*, 2012, 2(3): 233-240.
- [35] 张佳, 王慧杰, 何正权, 等. 农杆菌介导的籼稻 9311 和华占遗传转化体系的研究[J]. *中国水稻科学*, 2023, 37(2): 213.
- [36] NOTTENBURG C, RODRÍGUEZ C R. *Agrobacterium*-mediated gene transfer: A lawyer's perspective. In: *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*[M]. New York: Springer, 2008: 699-735.
- [37] KLEIN D T, KLEIN R M. Transmittance of tumor-inducing ability to avirulent crown-gall and related bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1953, 66(2): 220-228.
- [38] BROOThAERTS W, MITCHELL H J, WEIR B, et al. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria[J]. *Nature*, 2005, 433(7026): 629-633.
- [39] RAHMAWATI S, JEFFERSON O A, SOPANDIE D, et al. Comparative analysis of rice transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*[J]. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 2010, 15(1): 37-45.
- [40] VELÁZQUEZ E, PALOMO J L, RIVAS R, et al. Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(5): 247-251.
- [41] WENDT T, DOOHAN F, MULLINS E. Production of *Phytophthora infestans*-resistant potato (*Solanum tuberosum*) utilising *Ensifer adhaerens* OV14[J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(3): 567-578.
- [42] ZUNIGA-SOTO E, MULLINS E, DEDICOVA B. *Ensifer*-mediated transformation: An efficient non-*Agrobacterium* protocol for the genetic modification of rice[J]. *SpringerPlus*, 2015, 4: 600. doi: 10.1186/s 40064-015-1369-9.
- [43] 钟育海, 申艮宝. 植物基因的遗传转化方法[J]. *安徽农学通报*, 2010, 16(11): 65-66.
- [44] DAI S, ZHENG P, MARMEY P, et al. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 7(1): 25-33.
- [45] MCCABE D, CHRISTOU P. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration (ACCELL™ technology)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1993, 33(3): 227-236.
- [46] RUSSELL J A, ROY M K, SANFORD J C. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation[J]. *Plant Physiology*, 1992, 98(3): 1050-1056.
- [47] CHRISTOU P, FORD T L, KOFRON M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. *Technology*, 1991, 9(10): 957-962.
- [48] OARD J H, LINScombe S D, BRAVERMAN M P, et al. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice[J]. *Molecular Breeding*, 1996, 2(4): 359-368.
- [49] ZHANG S, CHEN L, QU R, et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(7): 465-469.
- [50] CAO J, DUAN X, MCEIROY D, et al. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11(11): 586-591.
- [51] SRIVASTAVA V, OW D W. Biolistic mediated site-specific integration in rice[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 8(4): 345-349.
- [52] CHO M J, YANO H, OKAMOTO D, et al. Stable transformation of rice (*Oryza sativa* L.) via microprojectile bombardment of highly regenerative, green tissues derived from mature seed[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(7): 483-489.
- [53] LI D, HAN X, ZUO J, et al. Construction of rice site-specific chloroplast transformation vector and transient expression of EGFP gene in *Dunaliella salina*[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011, 7(6): 801-806.
- [54] ELGHABI Z, KARCHER D, ZHOU F, et al. Optimization of the expression of the HIV fusion inhibitor cyanovirin-N from the tobacco plastid genome[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(5): 599-608.
- [55] LEE S M, KANG K, CHUNG H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny[J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(3): 401-410.
- [56] LI D, TANG N, FANG Z, et al. Co-transfer of TALENs construct targeted for chloroplast genome and chloroplast transformation vector into rice using particle bombardment[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2016, 16(12): 12194-12201.
- [57] YANG H, ZHANG H M, DAVEY M R, et al. Production of kanamycin resistant rice tissues following DNA uptake into protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*, 1988, 7(6): 421-425.
- [58] 王凤华, 刘俊, 童春义, 等. 电击法磁性纳米颗粒作为水稻转基因载体的研究[J]. *分析化学*, 2010, 38(5): 617-621.
- [59] OU-LEE T M, TURGEON R, WU R. Expression of a foreign gene linked to either a plant-virus or a *Drosophila* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat, and sorghum[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(18): 6815-6819.
- [60] TORIYAMA K, ARIMOTO Y, UCHIMIYA H, et al.

- Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6(9): 1072-1074.
- [61] FUKUOKA H, KAWATA M, TAKAIWA F. Molecular changes of organelle DNA sequences in rice through dedifferentiation, long-term culture, or the morphogenesis process[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26(3): 899-907.
- [62] DE PÁDUA V L M, FERREIRA R P, MENESES L, et al. Transformation of Brazilian elite indica-type rice (*Oryza sativa* L.) by electroporation of shoot apex explants[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19(1): 55-64.
- [63] REN Y, ZHAO J. Optimization of electroporation parameters for immature embryos of indica rice (*Oryza sativa*) [J]. *Rice Science*, 2008, 15(1): 43-50.
- [64] 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远缘杂交的分子基础: DNA 片段杂交假设的一个论证[J]. *遗传学报*, 1979, 6(4): 405-413.
- [65] HESS D. Investigations on the intra-and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as vectors[J]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1980, 98(4): 321-337.
- [66] SONG X, GU Y, QIN G. Application of a transformation method via the pollen-tube pathway in agriculture molecular breeding[J]. *Life Science Journal*, 2007, 4(1): 77-79.
- [67] 段晓岚, 陈善葆. 外源 DNA 导入水稻引起性状变异[J]. *中国农业科学*, 1985, 3(6): 11.
- [68] LUO Z, WU R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1989, 7(1): 169-177.
- [69] 刘国权, 孟巧霞, 倪进斌, 等. 水稻花粉管通道法育种研究[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(5): 75-77.
- [70] 何登骥, 詹庆才, 曾曙珍, 等. 利用外源 DNA 导入培育水稻品种研究新进展[J]. *作物研究*, 2002, 16(2): 100-101.
- [71] 王才林, 赵凌, 宗寿余, 等. 用花粉管通道法将 *bar* 基因导入水稻获得可遗传的转基因植株[J]. *江苏农业学报*, 2002, 18(3): 129-133.
- [72] MATSUOKA H, KOMAZAKI T, MUKAI Y, et al. High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot[J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(2): 185-194.
- [73] 罗忠训, 万树青, 夏桂先, 等. 克隆的玉米醇溶蛋白基因向水稻的成功转移[J]. *生物工程学报*, 1986, 2(2): 67.
- [74] 罗忠训, 万树青, 夏桂先, 等. 未传粉子房显微注射向水稻转移外源基因的研究[J]. *科学通报*, 1987, 32(11): 863-865.
- [75] FURUTA K, OKAMOTO T. Establishment of a microinjection with isolated rice egg cells and zygotes[C]. *Phytochemistry Regulation Society Research Publication Record Set*, 2014: 49 (in Japanese).
- [76] BASKARAN P, DASGUPTA I. Gene delivery using microinjection of agrobacterium to embryonic shoot apical meristem of elite indica rice cultivars[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 21(2): 268-274.
- [77] FRAME B R, DRAYTON P R, BAGNALL S V, et al. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation[J]. *The Plant Journal*, 1994, 6(6): 941-948.
- [78] NAGATANI N, HONDA H, SHIMADA T, et al. DNA delivery into rice cells and transformation using silicon carbide whiskers[J]. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(7): 471-473.
- [79] TERAOKAWA T, HASEGAWA H, YAMAGUCHI M. Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment[J]. *Breeding Science*, 2005, 55(4): 465-468.
- [80] MIZUNO K, TAKAHASHI W, OHYAMA T, et al. Improvement of the aluminum borate whisker-mediated method of DNA delivery into rice callus[J]. *Plant Production Science*, 2004, 7(1): 45-49.
- [81] ALBANESE A, TANG P S, CHAN W C W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2012, 14: 1-16.
- [82] WANG B, HUANG J, ZHANG M, et al. Carbon dots enable efficient delivery of functional DNA in plants[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, 3(12): 8857-8864.
- [83] MORTAZAVI S E, ZOHRABI Z. Biolistic co-transformation of rice using gold nanoparticles[J]. *Iran Agricultural Research*, 2018, 37: 75-82.
- [84] 彭子艾. 基于磁性纳米载体的水稻性细胞基因组定向编辑技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- [85] 彭子艾, 李丹丹, 夏澳运, 等. 磁性纳米颗粒负载质粒 DNA 的研究[J]. *华南农业大学学报*, 2020, 41(1): 78-82.
- [86] ABDULLAH R, COCKING E C, THOMPSON J A. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis[J]. *Bio/Technology*, 1986, 4(12): 1087-1090.
- [87] BITTENCOURT P A L, CSÁNYI Á, JENES B. Evaluation of different parameters and their influence on the PEG (polyethylene glycol) mediated gene transfer into rice (*Oryza sativa* L.) protoplasts[J]. *Cereal Research Communications*, 1995, 23(4): 359-365.
- [88] PENG J, KONONOWICZ H, HODGES T K. Transgenic indica rice plants[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83(6/7): 855-863.
- [89] UCHIMIYA H, FUSHIMI T, HASHIMOTO H, et al. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Molecular and General Genetics*, 1986, 204(2): 204-207.
- [90] ZHANG W, WU R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants[J]. *Theoretical*

- and Applied Genetics, 1988, 76(6): 835-840.
- [91] SUZUKI T, NONOMURA K I, TAKEDA N, et al. Application of enhanced lipofection to rice transformation[J]. Rice Genetics Newsletter, 2005, 20: 116.
- [92] ZHEN Z, HUGHES K, HUANG L, et al. Cationic liposome-mediated transformation of rice protoplasts[J]. Focus, 1990, 12: 41-44.
- [93] ZHU Z, HUGHES K W, HUANG L, et al. Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36(2): 197-204.
- [94] LIU H, KAWABE A, MATSUNAGA S, et al. Application of the bio-active beads method in rice transformation[J]. Plant Biotechnology, 2004, 21(4): 303-306.
- [95] MIZUKAMI A, NAGAMORI E, TAKAKURA Y, et al. Transformation of yeast using calcium alginate microbeads with surface-immobilized chromosomal DNA[J]. BioTechniques, 2003, 35(4): 734-740.
- [96] WADA N, CARTAGENA J A, KHEMKLADNGOEN N, et al. Bioactive bead-mediated transformation of plants with large DNA fragments[M]//MERAN R L, JAN P. Transgenic Plant, New Jersey: Wiley, 2012: 91-106.
- [97] YOONKONGKAEW N, SRIVATANAKUL M, NARANGAJAVANA J. Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*)[J]. Journal of Plant Research, 2007, 120(2): 237-245.
- [98] 袁隆平. 超级杂交水稻育种栽培学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2020: 329.
- [99] MACHO A P, ZIPFEL C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling[J]. Molecular Cell, 2014, 54(2): 263-272.
- [100] CORNELIS G R. The type III secretion injectisome[J]. Nature Reviews Microbiology, 2006, 4(11): 811-825.
- [101] SHARMA S, SHARMA S, HIRABUCHI A, et al. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells[J]. The Plant Journal, 2013, 74(4): 701-712.
- [102] RAMAN V, ROJAS C M, VASUDEVAN B, et al. *Agrobacterium* expressing a type III secretion system delivers *Pseudomonas* effectors into plant cells to enhance transformation[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 1-14.
- [103] TODA E, KOISO N, TAKEBAYASHI A, et al. An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice[J]. Nature Plants, 2019, 5(4): 363-368.
- [104] XU X, LIU C, WANG Y, et al. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021, 176: 113891. doi: 10.1016/j.addr.2021.113891.
- [105] HAN Y, BROUGHTON S, LIU L, et al. Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture[J]. Plant Communications, 2021, 2(2): 100082. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100082.
- [106] DEMIRER G S, SILVA T N, JACKSON C T, et al. Nanotechnology to advance CRISPR-Cas genetic engineering of plants[J]. Nature Nanotechnology, 2021, 16(3): 243-250.
- [107] BEYER P, AL-BABILI S, YE X D, et al. Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency[J]. The Journal of Nutrition, 2002, 132(3): 506S-510S.
- [108] PENG J, LYZNIK L A, LEE L, et al. Co-transformation of indica rice protoplasts with *gusA* and *neo* genes[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(3): 168-172.
- [109] LU Y, WANG J, CHEN B, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice[J]. Nature Plants, 2021, 7(11): 1445-1452.
- [110] WANG Y, UNDERWOOD C J. Apomixis[J]. Current Biology, 2023, 33(8): R293-R295.
- [111] WEI X, LIU C, CHEN X, et al. Synthetic apomixis with normal hybrid rice seed production[J]. Molecular Plant, 2023, 16(3): 489-492.
- [112] WANG B, ZHU L, ZHAO B, et al. Development of a haploid-inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding[J]. Molecular Plant, 2019, 12(4): 597-602.



郭涛, 研究员, 博士生导师。现任国家植物航天育种工程技术研究中心主任, 航天育种产业创新联盟副秘书长, 国家植物航天育种工程技术研究中心河源创新研究院院长。基于新一代航天工程, 开展水稻空间生物学研究, 解析空间环境与遗传进化的分子关联, 并开发水稻定向诱变育种新技术; 结合分子标记和复合杂交, 创制多基因聚合优异材料。获授权水稻生物育种关键技术专利12件; 第一完成人培育水稻新品种6个; 发表各类论文62篇, 2篇论文入选中国精品科技期刊顶尖学术论文; 现为国家重点研发计划课题负责人和国际原子能机构CRP项目首席科学家, 并参与省部级科研项目26项。先后获广东省科技进步奖、教育部优秀成果奖、广东省专利奖、广东省农业技术推广奖等省部级科研奖励6项。