

农杆菌介导的水稻遗传转化与植株再生

王玉珍¹, 罗景兰¹, 徐进^{1,2}, 刘香玲^{1,2}

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心, 河北 石家庄 050021; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:以水稻品种 ZH11 和 RBQ 为材料, 通过水稻成熟胚盾片诱导有效愈伤组织及农杆菌介导的遗传转化技术, 获得水稻转基因植株, 为水稻转基因体系的建立和完善奠定基础。结果表明: NMB 培养基适合水稻成熟胚盾片愈伤组织诱导, MS 培养基适合愈伤分化; 500 mg/L 谷氨酰胺或精氨酸有利于愈伤组织的形成; 培养条件: 愈伤组织诱导时温度 25~28℃, 暗培养, pH 5.8; 分化时温度 25~28℃, 光照 1 500~2 000 lx, 12~14 h/d, pH 5.8; 6-BA 对继代过程中愈伤组织的生长有促进作用; 潮霉素筛选的最佳浓度为 50 mg/L。

关键词: 水稻; 成熟种子; 组织培养; 有机营养物; 遗传转化

中图分类号: S511.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2005)02-0008-04

Genetic Transformation Mediated by Agrobacterium and Plantlet Regeneration of Rice

WANG Yu-zhen, LUO Jing-lan, XU Jin, LIU Xiang-ling

(1. Center for Agriculture Source, CAS, Shijiazhuang 050021, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Culturing mature rice (ZH11, RBQ) *in vitro*, the key techniques including explants disinfection, basic medium, organic nutrients, *et al.* and genetic transformation mediated by agrobacterium were studied. The results showed as following: NMB was suitable for the callus induction, and MS for differentiation. 500 mg/L of Glu or Arg redounded to the callus induction. All the cultures were kept under dark, 25-28℃, pH 5.8 for callus induction; and 25-28℃, 1 500-2 000 lx, 12-14 h/d, pH 5.8 for differentiation. 6-BA shows a significant result on the growth of callus; The optimal concentration of hygromycin is 50 mg/L.

Key words: Rice; Mature seeds; Tissue culture; Organic nutrients; Genetic transformation

农杆菌介导的遗传转化是水稻转基因的首选方法, 也是水稻遗传改良的有效手段。农杆菌介导的水稻遗传转化研究最早始于 1986 年, Baba^[1] 等将农杆菌原生质球与水稻原生质体通过 PEG 法介导融合, 获得的水稻愈伤组织能够在不含激素的基本培养基上生长, 而且有些愈伤组织还能合成胭脂碱。1994 年, Hiei^[2] 等首次实现对粳稻的高频转化, 转化率达到 28.6%, 并从分子水平和遗传学角度证实外源基因的稳定插入、表达和遗传。刘巧泉等^[3] 建立了农杆菌介导的水稻高效转基因体系, 在两个粳稻品种中转化率分别达到 87.6% 和 64.6%。至此, 农杆菌介导的水稻遗传转化技术日趋成熟, 在少

数水稻品种中实现了高频转化, 为应用研究奠定了基础。到目前为止, 仅少数实验室在个别基因型上取得了较高转化频率。本试验的目的是通过水稻成熟胚盾片诱导有效愈伤组织及农杆菌介导的遗传转化操作, 并获得水稻转基因植株, 为水稻转基因体系的建立完善奠定基础。

1 材料和方法

供试品种中花 11 (ZH11) (A) 和日本晴 (RBQ) (B) 由中国科学院遗传与发育所 804 组提供。

1.1 外植体消毒

采用成熟胚作为愈伤组织诱导的外植体。成熟

种子去壳后用 70 % 酒精表面消毒 30 s 后, 以 0.1 % HgCl_2 和 0.1 % HgCl_2 与 2 % NaClO 1:1 混合消毒剂分别对外植体灭菌处理 20 min。无菌水冲洗 5 ~ 6 遍, 灭菌滤纸吸干水分。

1.2 基本培养基制备

分别选用 MS, NB, NMB 作为基本培养基, 愈伤组织诱导培养基中加入 2 mg/L 2,4-D; 分化培养基为加入 2 mg/L KT; 生根培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L IBA。以上培养基中分别加入 500 mg/L 酶水解干酪素 (CH), 0 ~ 700 mg/L 谷氨酰胺或精氨酸, 蔗糖 30 ~ 80 g/L, 琼脂 6 g/L。pH 5.8。继代周期为 25 d。将淡黄色的胚性愈伤组织转入分化培养基中, 30 d 左右分化出芽。光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 12 ~ 14 h/d。以上每处理 30 个, 重复 4 次。

1.3 农杆菌菌株、质粒

农杆菌菌株和质粒由中国科学院遗传发育研究所 804 组提供。农杆菌菌株为根癌农杆菌 EHA105 菌株。质粒 pCambia1301 的 T-DNA 区含有潮霉素抗性和 GUS 基因 (图 1)。质粒经冻融法导入农杆菌中。

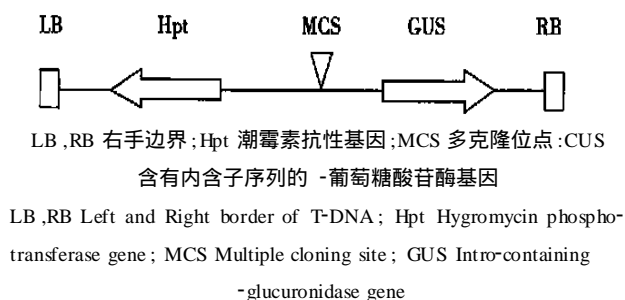


图 1 pCambia1301 中 T-DNA 区域

Fig. 1 T-DNA of pCambia1301

1.4 潮霉素抗性测试

将愈伤组织接种在含有 4 种不同浓度潮霉素抗性培养基 (25, 40, 50, 60 mg/L) 上, 26 °C 下暗培养 15 d。由愈伤组织生长状态确定适宜的筛选浓度。

1.5 转化、筛选与植株再生

依照刘巧泉等^[3]转化方法, 继代周期为 20 d。转化后的愈伤在含有头孢和潮霉素的抗性培养基上培养 3 ~ 4 代, 再转移到具有抗性的分化培养基中。幼芽长至 2 mm 转移到生根培养基中。

1.6 转化苗 PCR 检测

按照 Edwards 等^[4]的方法提取叶片总 DNA, 参照《分子克隆》^[5]的方法, 以潮霉素抗性基因做引物, 对转基因植株进行 PCR 检测。从分子水平上证明目的基因是否导入。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂的处理效果

材料的消毒灭菌是组织培养的第一步, 并且对外植体生长的影响较大。本试验比较了 2 种不同消毒剂的灭菌效果, 从图 2 可以看出, 不同消毒剂对水稻成熟种子消毒效果差异明显, 但同一消毒剂相同处理时间在两品种间的差异不显著; 采用 0.1 % HgCl_2 与 2 % NaClO 1:1 混合的消毒合剂处理外植体 20 min, 灭菌成功率达 88 %。愈伤组织生长状态最佳。利用消毒合剂的效果优于单独使用 HgCl_2 , 这表现在两方面: 消毒合剂在降低污染率的同时也降低了外植体的死亡率。 HgCl_2 虽有较强的杀菌能力, 但对植物细胞伤害较大, 易造成外植体材料的褐化死亡; 消毒合剂中 HgCl_2 的含量减少。由于 HgCl_2 有剧毒, 对人体有很大伤害, 并且易造成环境污染。因此, HgCl_2 用量的减少具有较高的应用价值。

2.2 基本培养基的确定

将消毒过的种子分别接种在 3 种不同培养基中, 诱导盾片愈伤形成和分化。结果表明, 不同培养基愈伤组织的生长状态差异明显 (图 3)。中花 11 在 NB 和 NMB 培养基上愈伤生长状况较好, 差异不显著。愈伤形成较早, 淡黄色, 分化率较高, 在 MS 培养基中愈伤生长状态最差。但在 MS 培养基中分化率最高; 日本晴在 NMB 培养基中愈伤生长状态较佳, 胚性愈伤较多, 同样在 MS 培养基中分化率最高。

2.3 有机添加物对愈伤组织生长的影响

已有大量试验表明, 在水稻愈伤组织诱导过程中加入一定浓度的有机添加物如脯氨酸、酵母提取物等可以有效促进愈伤组织的生长^[6]。本试验证实 (图 4), 在培养基中添加一定浓度的谷氨酰胺或精氨酸可以明显促进胚性愈伤组织的形成和幼苗的分化率, 最佳浓度在 300 ~ 500 mg/L。

2.4 激素对诱导愈伤的影响

已知 2,4-D 可以诱导水稻盾片愈伤组织的形成。本研究发现, 6-BA 对于维持有效愈伤的形态和数量起着至关重要的作用。在愈伤组织诱导前期, 6-BA 导致有效愈伤的减少, 同时出现褐化, RBQ 表现尤其明显, 分化能力降低。培养 20 d 时, RBQ 的有效愈伤达 54 %, ZH11 可达 60 %。但是, 培养 3 代以后, 在培养基中加入 6-BA, 可以对愈伤生长状况明显改善。

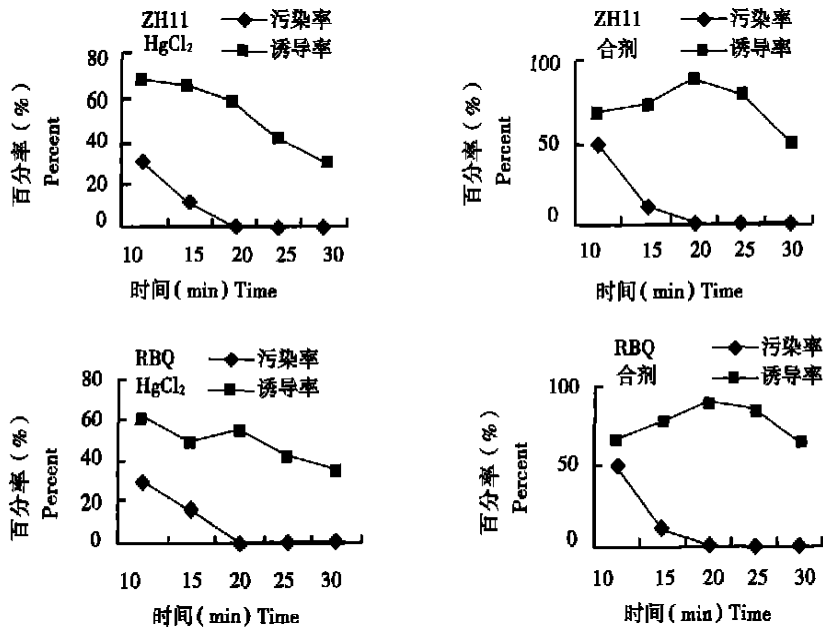


图2 不同消毒剂的灭菌效果

Fig. 2 Effects of different disinfectors on disinfection

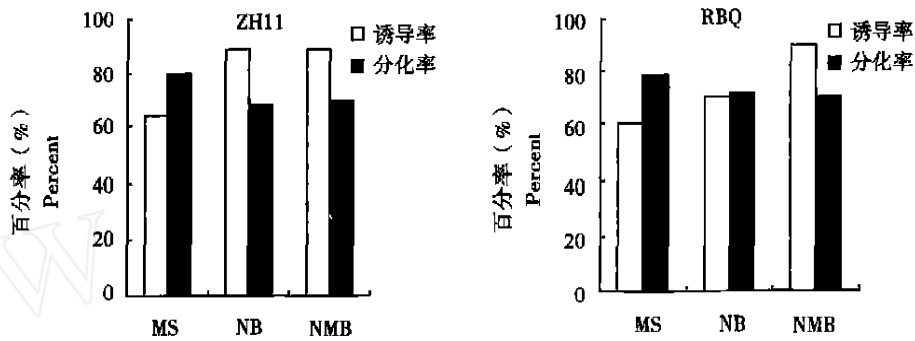


图3 基本培养基对愈伤组织诱导和分化的影响

Fig. 3 Effects of basic medium on induction and differentiation of callus

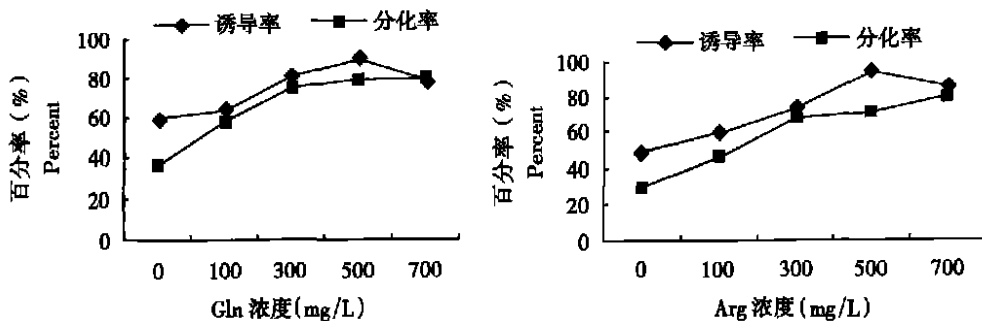


图4 不同浓度谷氨酰胺(Gln)或精氨酸(Arg)对愈伤组织生长的影响

Fig. 4 Effects of various concentration of Gln and Arg on the growth of callus

2.5 培养条件对愈伤组织生长和植株再生的影响

试验结果表明,温度是水稻愈伤组织生长的主要因子之一。当温度低于 20℃ 时,愈伤生长减缓;当温度高于 35℃ 时褐化现象明显增加(ZH11 尤其明显),愈伤组织死亡率升高。25~28℃ 是生长的最佳温度。

继代 4~5 代的愈伤组织可转入分化培养基中。

试验表明,培养初期照光褐化率明显增加,不利于愈伤组织的分化。25~35 d 芽开始分化,一般芽长 1~2 cm 时转入光照培养。转入光照培养 3~5 d 后,苗逐渐转绿,20 d 后株高 5~6 cm,试管苗生长健壮。将生长健壮的试管苗转入生根培养基中。在生根培养基中培养 15~20 d 进行移栽。为使移栽后的试管苗保持一定的空气湿度,采用塑料膜进行覆

盖,空气湿度在 85 %左右为宜。移栽成活率 95 %以上。移栽 10 d 左右逐渐进行适当通风,15 d 左右去掉塑料膜,进行常规管理。

2.6 潮霉素抗性测试

未转化的愈伤组织在不同浓度潮霉素抗性培养基上生长 10 d。试验表明,潮霉素浓度为 50 mg/L 时,ZH11 和 RBQ 的愈伤组织生长受到抑制,并褐化死亡。这对于转化实验中筛选培养基潮霉素浓度的确定提供了依据。

2.7 转化

共培养 2~3 d 的愈伤组织经脱菌处理后,转至筛选培养基上,14 d 后可见新鲜愈伤组织从褐化的愈伤团中生长出来,而未转化的愈伤组织则很快褐化死亡。这时选取新鲜生长的愈伤组织进行继代培养,3~4 代后进行分化培养和生根培养,得到再生植株。结果表明(表 1),以 ZH11 和 RBQ 成熟胚盾片愈伤组织作为转化受体,以 EHA105 菌株做转化载体建立的水稻转化体系其转化频率和再生植株的频率较高。

表 1 ZH11 和 RBQ 的转化频率

Tab. 1 Transformation efficiencies of ZH11 and RBQ

品种	接种愈伤数(个)	潮霉素抗性愈伤数(个)	抗性愈伤再生植株数(株)	PCR 检测抗性阳性植株数(株)	转化频率(%)
ZH11	200	112	94	87	43.5
RBQ	200	102	89	84	42.0

3 讨论

农杆菌介导的遗传转化是一个受许多因素影响的复杂的生物学过程。基因型、基本培养基、激素配比、共培养、共培养基培养基中乙酰丁香酮的含量、农杆菌的生理状态及菌液浓度都会影响转化效率(转化效率(%) = PCR 检测抗性阳性植株数/接种的愈伤数 × 100)^[7~11]。另外还有一个极重要的因素是愈伤组织的状态。研究表明,愈伤生长情况直接影响了转化及植株再生的频率。提高生长旺盛、处于胚性状态的愈伤组织的数量,是提高转化效率的重要手段。

农杆菌介导的转化主要作用于外植体表层细胞,因此在选择待转化的愈伤组织时,应选取大小适中的胚性愈伤组织进行转化。较大愈伤组织转化时,再生植株细胞常起源于深层细胞,难以获得转化株,容易出现嵌合体。

施加适宜的潮霉素选择压,是筛选水稻转化细

胞,获得抗性愈伤组织,并获得转基因水稻的关键。潮霉素浓度过低,非转化细胞大量成活,转化细胞逐渐丢失;过高,转化细胞死亡,会降低转化率。

用农杆菌转化单子叶植物时,应选择处于适宜生理状态的组织作为转化受体,如能够产生 vir 基因活化分子;不产生或很少产生细菌毒素;内源激素浓度稳定;农杆菌较易附着于细胞壁上;细胞分裂和 DNA 合成旺盛,有利于 T-DNA 的插入与整合^[9]。在农杆菌转化水稻的报告中,认为共培养阶段添加能活化 vir 基因的酚类化合物是转化成功的因素之一^[1,2,9~12]。但也有报道认为这些酚类物质对于提高转化效率几乎没有贡献^[3]。本试验研究结果表明,酚类物质对于提高转化效率有显著影响。在共培养前 4 h 加入 AS,可明显提高转化效率。

愈伤组织继代 3 代后,若 2,4-D 与 6-BA 配合使用,可以明显改善其生长状况。前期加入 6-BA 反而抑制愈伤诱导。这可能是前期处于脱分化时期,愈伤组织不需要外源细胞分裂素。而经过几次继代后,需要补充外源激素才能维持内源生长素与细胞分裂素的比例平衡,因此一定浓度细胞分裂素与 2,4-D 协调使用保持了愈伤良好的生长和细胞分裂。

参考文献:

- [1] Baba A, Hasezawa S, Syono K. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1986, 27: 463 - 468.
- [2] Hiei Y, Ohta S. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, 6: 271 - 282.
- [3] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立[J]. *植物生理学报*, 1998, 24 (3): 259 - 271.
- [4] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 1 (6): 1349.
- [5] 萨姆布鲁克, 弗里奇. 分子克隆(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 672 - 683.
- [6] 叶和春. 水稻细胞悬浮培养及再生植株的研究[J]. *植物学报*, 1984, 26(1): 52 - 59.
- [7] 张玲, 谢崇华, 李卫锋. 水稻成熟胚组织培养研究[J]. *杂交水稻*, 2002, 17(2): 44 - 46.
- [8] Diah R, Tzkehiko H. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Javanica Rice cv. Rojolele[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(6): 1193 - 1200.
- [9] Lin Y J, ZHANG Qi-fa. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2004, (43): 6.
- [10] Ramesh S, Nagadhara D. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Science*, 2004, (166): 1077 - 1085.
- [11] 曹明霞, 卫志明, 黄健秋. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化[J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5): 423 - 427.