

农杆菌介导转化水稻成熟胚影响因素研究

尹福强¹, 刘 铭¹, 蔡光泽¹, 李 平²

(1.西昌学院, 四川 西昌 615013; 2.四川农业大学 水稻研究所, 四川 温江 611130)

【摘要】 实验对蜀恢881、蜀恢527、中花9号等7个水稻品种的成熟胚为受体材料,研究了影响农杆菌转化水稻频率的几个重要因素,实验结果表明:CC培养基是籼稻成熟胚愈伤组织的最适诱导培养基,而NB培养基是粳稻品种成熟胚的最适诱导培养基;诱导培养基中添加ABA并不能显著提高籼稻和粳稻成熟胚愈伤组织的诱导率,但在ABA为3mg/L时可以明显改善愈伤质量;适当的低温预处理可以不同程度提高诱导率;农杆菌菌株EHA105对水稻愈伤组织的转化能力优于LBA4404和AGL1;在分化时,采用适宜的激素配比有利于提高分化率。

【关键词】 水稻; 成熟胚; 诱导; 转化; 农杆菌

【中图分类号】S511.033 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2005)04-0037-04

自1983年Zambryski等利用农杆菌转化法获得首例转基因烟草以来,这一转化方法已在双子叶植物中得到了广泛的应用。由于单子叶植物不是农杆菌的天然寄主而对农杆菌反应不敏感,曾一度限制了其在单子叶植物中的应用。后来的研究发现,只要在单子叶植物的浸染过程中加入乙酰丁香酮等小分子酚类化合物,农杆菌也可以成功地实现浸染^[1]。近年来,水稻基因转化取得了可喜的成绩^[2,3],幼胚因出愈率高、胚性好而被认为是理想的转化受体^[4],但其取材受季节限制,操作复杂费时费力且易污染,从而限制了其在基因工程中应用的持续性^[5]。一般认为,成熟胚诱导效率不高、继代易褐化、胚性不好,尤以籼稻更甚^[4]。但已有的一些研究表明^[5,6],对诱导和继代条件适当优化,来源于成熟胚的愈伤组织仍可获得良好的效果。而且,成熟胚取材不受季节限制、操作简便,可以持续不断地提供转化受体,如果能摸索条件提高其诱导率和转化率,使其在基因工程中得到更广泛的应用,势必将会促进功能基因组学和基因工程本身的发展。

本研究选用几个籼稻和粳稻的成熟胚作为转化受体材料,对影响农杆菌转化水稻效率的几个主要因素进行了系统研究,旨在建立起一种转化效率高、稳定性好、通用性强的水稻农杆菌转化体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

籼稻:蜀恢881(SH881)、蜀恢527(SH527)、明恢63(MH63)、D62B、D香B(DXB)

粳稻:中花9号(ZH9)、日本晴(J)

1.2 质粒和农杆菌菌株

质粒pCUGNA-hyg来自中科院遗传与发育生物学研究所遗传操作实验室,农杆菌株EHA105、AGL1、LBA4404由本实验室保存。

1.3 水稻愈伤组织的诱导

实验所用的基本培养基是MS培养基^[7]、N6培养基^[8]、NB培养基^[9]和CC培养基^[10]。诱导培养基是基本培养基中加2,4-D(2.0mg/L)和ABA(0~5.0mg/L)。

1.3.1 培养基实验 成熟种子去壳消毒后,分别接种到N6、NB、MS和CC诱导培养基上。27℃±1℃暗培养8~12天,诱导愈伤组织,待胚芽长到1cm,严格挑选质量好的无菌胚性盾片愈伤愈伤组织用于继代,并统计其出愈率。

1.3.2 低温预处理 把成熟种子去壳后置4℃冰箱分别处理0,3,6,9,12天,经灭菌后,接种到CC诱导培养基上,10天时统计其出愈率。

1.4 农杆菌介导转化水稻愈伤组织

用无菌牙签从YRK(YEP+Rif+Km)平板上挑取生长健壮的单菌落至YRK液体培养基中,28℃,250rpm振荡培养过夜,2800rpm离心10分钟,倒掉上清液,用YEP液体培养基稀释菌体,至OD₆₀₀值为0.5,并加入100umol/L的AS用于转化。将选取的无菌继

收稿日期:2005-06-06

作者简介:尹福强(1977-),男,硕士,主要从事基因工程和作物遗传育种研究。

代愈伤组织转入一无菌培养皿中,用农杆菌液浸泡 15~25 分钟,用无菌滤纸吸干,转入共培养基中,27℃ ±1℃ 暗培养 2~3 天。共培养至可见农杆菌菌落时,先用无菌水冲洗 8~10 次,再用含 200~500mg/L Cef 或 250~500mg/L Cb(或配合使用)的无菌水充分振荡洗涤 1~2 次。洗后将愈伤组织在无菌滤纸上吸水培养 2~3 天或在超净工作台上吹干 2~3 小时,转入预培养基培养 6~7 天,结束后在筛选培养基上进行选择培养,潮霉素筛选 2~3 次。

1.5 分化与生根

将得到的抗性愈伤接种到分化培养基上进行光照培养。约 1~2 个月,将 2cm 左右高的幼苗转到生根培养基上(1/2MS)生根,当苗长至 10cm 高时,拔掉试管棉塞,并在培养基中加水,进行适应性开放培养,待苗适应后,洗净根部的培养基,移栽于温室或大田中。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对水稻成熟胚愈伤组织诱导能力的影响

表1 不同培养基对水稻成熟胚愈伤组织诱导率的影响

培养基	SH881	SH527	MH63	D62B	DXB	ZH9	J
MS	55.8	73.2	66.4	63.5	63.6	73.3	85.0
N6	59.7	74.6	70.9	54.6	69.82	72.4	79.1
NB	66.3	75.8	78.5	58.6	70.1	82.2	90.3
CC	68.5	75.9	78.6	71.7	78.9	76.3	88.6

注:表中数据为愈伤组织诱导率(%)

实验结果(见表1)表明:4种基本培养基对水稻成熟胚愈伤组织的诱导能力是不同的,籼稻品种的成熟胚在CC培养基上的平均出愈率最高,其次是NB培养基,而在MS培养基上的平均出愈率最差。对于粳稻品种,则以NB培养基的出愈率为最高,在CC培养基上的出愈率次之,N6培养基上的出愈率则最

差。这与易自立^[15]等(2001)的研究结果相似。因此,在水稻成熟胚的诱导过程中,对于籼稻,一般用CC培养基作为基本培养基;而对于粳稻,则以NB培养基作为基本培养基。

2.2 ABA对水稻成熟胚愈伤组织诱导能力和生长状态的影响

表2 ABA对成熟胚诱导率的影响

ABA浓度	SH881	SH527	MH63	D62B	DXB	ZH9	J
0 mg/L	69.0	75.6	78.9	71.8	78.3	82.1	90.2
1.0 mg/L	69.5	75.3	77.4	71.9	78.1	82.3	90.4
3.0 mg/L	70.1	75.5	78.6	72.0	78.8	81.9	89.9
5.0 mg/L	68.2	76.1	79.1	71.3	77.5	82.2	90.

注:表中数据为愈伤组织诱导率(%)

易自立^[5]等(2001)的研究结果表明:在诱导培养基中添加适当的ABA能够不同程度地提高籼稻品种的出愈率,粳稻则对ABA不敏感。但本作者研究发现(见表2),不管是籼稻还是粳稻,其成熟胚对ABA都不敏感,但在诱导培养基中添加3mg/L的ABA时,

则可以明显改善供试材料愈伤组织的生长状态,使其愈伤组织结构紧密、颜色淡黄、表面干爽,颗粒状更加明显。

2.3 低温预处理对水稻成熟胚愈伤组织诱导能力的影响

表3 低温预处理对水稻成熟胚诱导率的影响

处理时间	SH881	SH527	MH63	D62B	DXB	ZH9	J
0	68.7	75.9	78.6	71.6	79.0	82.8	89.6
3	69.7	79.4	84.3	73.7	87.4	82.3	89.9
6	70.3	80.4	77.6	78.4	82.2	86.2	91.3
9	67.5	81.6	70.9	72.2	80.6	85.4	93.2
12	66.8	78.9	50.0	68.9	78.5	82.0	85.4

注:表中数据为愈伤组织诱导率(%)

近来的研究表明低温预处理对水稻幼胚的出愈和再生均具有明显的作用^[6],但低温预处理对成熟胚是否也具有相同作用呢?从表3可以看出:除SH881的低温处理作用不明显外,其它6个材料的出愈率都得到了明显的提高。但并不是处理时间越长越好,实验结果表明,一般低温处理3~9天可以提高

出愈率,继续处理,则出愈率下降,可能是过长的低温处理时间造成了胚活力的显著下降。这以MH63表现最为明显,在处理3天时,出愈率由不处理的78.6%提高到84.3%,当继续低温处理,出愈率显著下降,到12天时,出愈率仅为50.0%。

2.4 不同农杆菌菌株对转化频率的比较

表4 农杆菌不同菌株的转化效果

菌株	SH881	SH527	MH63	D62B	DXB	ZH9	J
LBA4404	10.7	14.4	7.4	4.9	16.8	24.4	22.3
AGL1	9.4	12.9	5.7	3.3	14.3	20.2	21.4
EHA105	11.6	16.2	8.9	5.7	18.4	26.3	25.7

注:表中数据为愈伤组织转化率(%)

实验结果表明,不同的农杆菌菌株对水稻愈伤组织的转化能力是不同的,从表4数据可知,EHA105的转化效果最好,其次是LBA4404,AGL1的转化效果则最差。此外,不同水稻亚种对农杆菌的敏感性也

是有差别的,很明显,粳稻比籼稻更敏感,转化率也更高。

2.5 分化培养基的激素配比

激素在愈伤组织分化过程中起着非常重要的作

表5 分化培养基激素配比对分化的影响

激素配比(mg/L)	SH881	SH527	MH63	D62B	DXB	ZH9	J
6-BA(1.0)+KT(1.0)+NAA(0.5)	42.0	50.3	57.4	46.5	58.1	73.2	68.7
6-BA(1.0)+KT(0.5)+NAA(1.0)	41.7	48.1	55.6	44.3	56.2	65.5	63.3
6-BA(0.5)+KT(1.0)+NAA(1.0)	40.1	45.8	45.4	40.8	48.5	59.4	63.5
6-BA(1.0)+KT(1.0)+NAA(1.0)	42.3	47.6	57.1	43.9	57.0	70.2	65.4
6-BA(0.5)+KT(0.5)+NAA(0.5)	38.9	43.5	42.6	38.4	43.3	57.7	48.1

注:表中数据为愈伤组织分化率(%)

用,实验中采用几种不同的激素浓度配比来分析它们对愈伤组织分化率的影响。实验结果表明,在分化过程中,以6-BA(1.0)+KT(1.0)+NAA(0.5)的激素配比效果为最佳,其愈伤组织的现绿时间早、绿点多,分化率高(表5)。

3 讨论

在我们的研究中可以看到,籼稻与粳稻转化有明显的差别,籼稻品种的转化效率一般比粳稻品种低,而且在籼稻的不同品种间,也存在较明显的差

异,这与易自立等人的研究是一致的^[5,6]。这种转化上的差异是不同水稻品种在愈伤组织诱导与分化能力上的差异,及其对农杆菌侵染和筛选剂反应敏感性上的差异等多种因素综合作用的结果,这些差异可能与水稻不同品种在细胞受伤后的生理反应不同(如小分子酚类化合物的分泌或共抑制的产生)、细胞内源激素水平的不同(影响细胞的生长分化)、细胞壁结构上的差异(影响细菌吸附)等因素有关。显然,这种明显的基因型依赖性是影响转化效率的关键因素之一。除此之外,影响成熟胚愈伤组织诱导及转化再生能力的还包括外源激素、渗透压、固化剂、培养基成分以及温度、光周期和继代时间等。另外,也有报道指出轻度的渗透(脱水)处理可以提高水稻愈伤组织的再生能力,处理的方式有提高琼脂

糖浓度、加入适宜浓度的甘露醇或山梨糖醇或做部分干燥处理等,这种作用的机理可能是因为失水状态造成了细胞的饥饿而引起一系列生理、生化上的变化,并引起内源激素的变化,从而促进胚胎的形成与分化。实验中我们也进行了类似的试验,得到了相同的试验结果。

总之,水稻的成熟胚从愈伤组织的诱导到遗传转化受多种因素的影响和制约,但只要我们通过改进转化中的某些主要环节,达到改善愈伤生长状态、提高愈伤质量、增加抗性愈伤率和愈伤分化率的目的,就可以建立一套高效适用的基于农杆菌转化为目的水稻成熟胚愈伤组织转化体系。

致谢:感谢农学系王志民副教授的指导!

参考文献:

[1] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. *Physis Plant*, 1962, 15:473~479.
 [2] Chu C C. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops[J]. *Proc Symp Plant Tissue Culture*. Peking: Science Press, 1978.43~50.
 [3] Li L C, Qu R D, Kochko A, et al. An improved rice transformation system using the biolistic method[J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12:250~255.
 [4] Potrykus I, Harms C T, Lorz H. Callus formation from cell culture protoplasts of corn. *Thero Appl Genet*, 1979, 54: 209~214.
 [5] 易自立,曹守云,王力等.提高农杆菌转化水稻频率的研究. *遗传学报*, 2001, 28(4):352~358.
 [6] 叶松青,储成才,曹守云等.提高农杆菌转化水稻频率研究[J]. *遗传学报*, 2001, 28(10):933~938.

Study on Some Factors Influencing Agrobacterium-Mediated Transformation of the Mature Embryos of Rice

YIN Fu-qiang¹, LIU Ming¹, CAI Guang-ze¹, LI Ping²

(1. Xichang College, Xichang 615013, Sichuan;

2. Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, Sichuan)

Abstract: Several important factors influencing transformation frequency of rice mediated by *Agrobacterium* were researched with seven indica and japonica rice cultivars such as SH881, SH527, ZH9 and so on. For indica rice, CC medium is the best for callus initiation. For japonica rice, NB medium is the best for callus initiation. Lead ABA in the culture not to improve the initiation rate of the mature embryo of indica rice and japonica rice notably, But can obviously improve and injure quality in ABA for 3mg/L; The proper low-temperature pretreatment can improve the initiation rate; The transformation ability of *Agrobacterium* strain EHA105 is superior to LBA4404 and AGL1 to rice; While differentiation, it helps to improve the differentiation rate to adopt suitable hormone combination.

Key words: Rice; Mature embryo; Initiation; Transformation; *Agrobacterium*

(责任编辑:李道华)