

·技术与方法·

一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统

陈惠^{1, 2}, 赵原¹, 种康^{1*}

¹ 中国科学院植物研究所, 光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

² 山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004

摘要 以成熟胚愈伤组织为材料的农杆菌介导水稻转化法虽已建立, 但转化频率仍有待提高。本文以粳稻(*Oryza sativa*)品种(中花10号和中花11号)的成熟胚诱导的愈伤组织为受体材料, 对组织培养体系及影响遗传转化的因素进行优化, 建立了一套改进的农杆菌介导的水稻高效遗传转化系统。农杆菌菌株为EHA105, 质粒载体是pUN1301/Os RAA1, 其中含有标记基因GUS和筛选基因HPT。愈伤组织诱导培养基为NBD2 (NB+2 mg·L⁻¹2,4-D), 继代培养基为NBD0.5, 预分化与分化培养基为RE1 (MS+1 mg·L⁻¹6-BA+0.25 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹KT+0.2 mg·L⁻¹ZT)和RE2 (MS+1 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹KT+0.2 mg·L⁻¹ZT)。另外, 还分析了影响T-DNA转移的多种因素, 如外植体种类、愈伤组织预培养基和愈伤组织继代次数等。采用优化的转化程序, 水稻愈伤组织转化率和植株转化率可达70%以上。

关键词 农杆菌介导的遗传转化, 成熟胚诱导的愈伤组织, 水稻

陈惠, 赵原, 种康 (2008). 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效转化系统. 植物学通报 25, 322 -331.

水稻高效遗传转化体系是进行水稻基因功能分析、创建T-DNA插入突变体库(高东迎等, 2007)和遗传改良的基础。利用根瘤农杆菌转化水稻成熟胚愈伤组织已有不少报道(Rashid et al., 1996; 章冰和卫志明, 1999; 黄健秋等, 2000; Sallaud et al., 2003), 但大多数情况转化频率不高, 较理想的在20% - 30%, 低于幼胚来源的愈伤组织的转化率(黄健秋等, 2000)。由于成熟胚取材便利, 不需要温室等设施, 也不受时间和季节的限制, 所以用成熟胚诱导愈伤组织的转化法备受青睐。

我们用中花10号和中花11号2个水稻品种成熟胚愈伤组织为材料, 在优化其高频再生的基础上, 比较分析愈伤组织继代次数、预培养的培养基组分和农杆菌浓度等因素, 优化了以水稻成熟胚愈伤组织为受体材料的遗传转化条件, 建立了一套水稻成熟胚来源的愈伤组织高效遗传转化系统。利用这套水稻转化系统, 我们对本实验室克隆的多个水稻基因的功能进行了分析(Ge et al., 2004; Xu et al., 2005; Zhuang et al., 2006; Jiang et al., 2007), 验证了该系统的适用性、可靠性和高效性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

粳稻品种中花10号和中花11号(*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Zhonghua 10, 11)由中国农业科学院李梅芳提供。

1.2 外植体的种类和消毒

将2个水稻品种的幼胚、幼嫩种子(开花后10-14天取材)、成熟胚和成熟种子等4种外植体, 接种在设计好的培养基上, 于25°C、黑暗条件下进行愈伤组织的诱导和继代培养。

成熟种子的消毒: 先用70%(v/v)乙醇处理3分钟, 再用0.1%(w/v)升汞(每升加5-6滴吐温-80)浸泡12-13分钟, 无菌水冲洗4-5次, 用无菌纸吸干种子表面水分后接种。

成熟胚的取用: 取消毒后的成熟种子, 用无菌水浸泡, 12-16小时后, 转移到无菌培养皿中, 用无菌纸吸干

收稿日期: 2007-06-20; 接受日期: 2007-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30670185)

* 通讯作者。E-mail: chongk@ibcas.ac.cn

水分, 再用解剖刀剥取成熟胚, 盾片朝上将其接种到培养基上。

幼嫩种子的消毒: 剥去颖壳, 用 70% 乙醇浸泡 1~3 分钟, 0.1% 升汞处理 7~10 分钟, 无菌水冲洗 5~6 次, 用无菌纸吸干多余水分后接种。

幼胚的取用: 消毒后的幼嫩种子, 在无菌条件下用解剖刀直接剥取幼胚, 盾片朝上接种。

1.3 愈伤组织诱导培养基和芽分化培养基

本实验所选用的愈伤组织诱导、继代、预分化、分化及遗传转化培养基成分见表 1。

1.4 质粒载体的构建和农杆菌菌株

用双元表达载体 pCAMBIA1301 在 *Hind* III 和 *Eco* RI 2 个酶切位点之间插入玉米泛素蛋白基因启动子(*Ubi1pro*)和 *Nos ter* 序列, 得到质粒 pUN1301。该质粒含有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)和 *GUS* 基因, 二者均被 CaMV 35S 启动子驱动。在 *Ubi1Pro* 后引入 *Bam* HI、*Sma* I、*Kpn* I 和 *Sac* I 4 个酶切位点。将经测序验证的 *OsRAA1*

片段用 *Pst* I 和 *Bam* HI 连接到 pBluescript II SK 质粒中, 再用 *Kpn* I 和 *Sac* I 切下目的片段, 连接到 pUN1301 的相应位点, 得到含有 *Ubi1Pro::OsRAA1* 的植物表达载体 pUN1301/*OsRAA1*(Ge et al., 2004)。将 *OsRAA1* 片段反向插入到 pUN1301 质粒的 *Ubi1* 启动子下游得到 pUN1301/anti-*OsRAA1* 反义表达载体。

利用冻融法将上述 2 种质粒导入农杆菌菌株 EHA105 中(Holsters et al., 1978)。

1.5 根癌农杆菌的培养、转化及筛选

根癌农杆菌的培养参照黄健秋等(2000)的方法并加以改进。从平板上挑取分别含有 2 种质粒 pUN1301/*OsRAA1* 和 pUN1301/anti-*OsRAA1* 的 EHA105 单菌落, 接种到 5 mL 含 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 50 mg·L⁻¹ 潮霉素的 YEB 液体培养基中。在 28°C 黑暗条件下, 在摇床上以每分钟 200 转的速度振荡培养至 OD₆₀₀=0.5, 然后以 1:100 比例重新接种到新鲜的 YEB 培养基中振荡培养, YEB 培养基中所含抗生素和培养条件同前。当 OD₆₀₀=0.5 时, 将菌液以相对离心力 6 000 ×g, 4°C

表 1 用于水稻组织培养和转化的培养基

Table 1 Media used for tissue culture and transformation of rice

Media	Composition
NB	N ₆ (朱至清和孙敬三, 1975) major salts B ₅ (Gamborg et al., 1968) minor salts and B ₅ vitamins+300 mg·L ⁻¹ casamino acid+500 mg·L ⁻¹ proline+500 mg·L ⁻¹ glutamine+30 mg·L ⁻¹ sucrose+7 mg·L ⁻¹ agar, pH 5.8
NBD0.5	NB medium+0.5 mg·L ⁻¹ 2,4-D
NBD2	NB medium+2 mg·L ⁻¹ 2,4-D
AA MD0.5-As	AA M medium (Hiei et al., 1994)+100 μmol·L ⁻¹ acetosyringone+0.5 mg·L ⁻¹ 2,4-D, pH 5.2
NBD2-As	NBD2 medium+100 μmol·L ⁻¹ acetosyringone+10 g·L ⁻¹ glucose, pH 5.2
NBD0.5-CH ₁	NBD0.5 medium+600 mg·L ⁻¹ cefotaxime+25 mg·L ⁻¹ hygromycin
NBD0.5-CH ₂	NBD0.5 medium+300 mg·L ⁻¹ cefotaxime+50 mg·L ⁻¹ hygromycin
RE1-CH	MS (Murashige and Skoog, 1962)+30 g·L ⁻¹ sucrose+20~30 g·L ⁻¹ sorbitol+500 mg·L ⁻¹ casamino acid+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.25 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ KT+0.2 mg·L ⁻¹ ZT+300 mg·L ⁻¹ cefotaxime+50 mg·L ⁻¹ hygromycin+10 g·L ⁻¹ agar, pH 5.8
RE2-H	MS+30 g·L ⁻¹ sucrose+10~20 g·L ⁻¹ sorbitol+500 mg·L ⁻¹ casamino acid+1 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.5 mg·L ⁻¹ KT+0.2 mg·L ⁻¹ ZT+50 mg·L ⁻¹ hygromycin+8 mg·L ⁻¹ agar, pH 5.8
MS ₀	MS major salts, MS minor salts and MS vitamins+20 g·L ⁻¹ sucrose+7 mg·L ⁻¹ agar or 2.5 g·L ⁻¹ gelrite, pH 5.8
MS ₀ -H	MS ₀ medium+70 mg·L ⁻¹ hygromycin
1/2 MSNM	Half-strength MS major salts, MS minor salts and MS vitamin+20 g·L ⁻¹ sucrose+0.2 mg·L ⁻¹ NAA+1.0 mg·L ⁻¹ MET(paclobutrazol)+7 mg·L ⁻¹ agar, pH 5.8
1/2 MSNMH	1/2 MSNM medium+50 mg·L ⁻¹ hygromycin

离心 10 分钟, 收集菌体, 并按 1:1 重悬于 AAMD0.5-As 液体培养基中。

将在 NBD0.5 或 NBD2 上预培养 4 - 5 天的水稻愈伤组织切成 0.3 - 0.4 mm 大小, 浸入农杆菌悬液中 20 分钟, 在无菌滤纸上吸干多余的菌液后, 置于铺有一层无菌滤纸的 NBD2-As 培养基上, 黑暗中培养 3 天。收集愈伤组织, 并用含 500 mg·L⁻¹ 头孢霉素的无菌水冲洗 3 次, 吸去多余水分, 将愈伤组织转入筛选培养基 NBD0.5-CH₁ 中培养 2 周, 再移到 NBD0.5-CH₂ 培养基上继续筛选 2 次, 每次 2 周。最后, 得到鲜黄色的潮霉素抗性愈伤组织。

1.6 转基因植株的再生

为了提高植株分化率, 先对抗性愈伤组织进行部分干燥处理, 即将愈伤组织放在铺有一层无菌滤纸的培养皿中, 25°C、黑暗条件下自然干燥 1 - 2 天。然后将这些愈伤组织分割成 2 mm 的小块, 转移到预分化培养基 RE1-CH 上培养 12 - 15 天, 其中前 6 - 7 天黑暗培养, 后 8 - 9 天光照培养, 光照强度为 45 - 55 mmol·m⁻²·s⁻¹。之后, 将已分化出不定芽的愈伤组织转移到分化培养基 RE2-H 中培养 15 天, 可使不定芽长成高 2 - 4 cm 的小苗。最后, 这些小苗被分开转移到 1/2 MSNMH 生根培养基中, 2 周后生根, 移栽到盛有营养土的水桶中, 在温室中栽培至收获。

1.7 转基因植株GUS表达的组织化学检测

鲜黄色潮霉素抗性愈伤组织、未分化抗性愈伤组织、移栽前小苗的叶片(用刀片轻轻划伤)和根可用于 GUS 染色鉴定。具体方法参照文献(Jefferson, 1987; 黄健秋等, 2000)所述。将以上组织切块并置于 X-Gluc 反应液中(pH7.0, 50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液, 0.1% Triton X-100, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.5 mmol·L⁻¹ 亚铁氯化钾, 0.5 mmol·L⁻¹ 高铁氯化钾, 0.5 mg·L⁻¹ X-Gluc), 37°C 保温 3-20 小时。染色后的组织, 用 70% 乙醇脱色, 观察蓝色反应。愈伤组织或叶片、根系等具蓝色斑点者为 GUS 阳性。

1.8 转基因植株的PCR 检测

按 Dellaporta 等(1983)的方法, 取 T₀ 幼苗叶片和萌发 2 周的 T₁ 代植株叶片(长 3 - 4 cm), 提取水稻植株的总 DNA。根据 *Ubi1* 启动子和 *OsRAA1* 序列, 设计合成一对引物 P1(5'-CGGTCGTTCATTCGTTCTAG-3') 和 P2 (5'-GATCTTGCTTACTTGCTGGC-3'), 以便鉴定外源 *OsRAA1* 的存在。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 阳性植株将出现 483 bp 条带(含 *Ubi1* 3' 端 350 bp 和 *OsRAA1* 5' 端 133 bp)。PCR 程序: 94°C 变性 5 分钟; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒, 35 个循环; 72°C 延伸 10 分钟。

1.9 T₁代植株的潮霉素抗性检测

收获的转基因 T₁ 代种子(9 个转正义 *OsRAA1* 株系, 2 个转反义 *OsRAA1* 株系)经常规消毒灭菌, 接种到 MS₀-H 培养基上, 12 小时光照/12 小时黑暗、25°C 条件下培养。10 天后统计抗潮霉素的幼苗数, 能正常萌发为绿色小苗的为抗性植株。

2 结果与分析

2.1 水稻高频再生系统的建立

筛选适宜的外植体是建立水稻高频再生系统的关键因素之一。用 2 个水稻品种的 4 种外植体诱导愈伤组织。4 种外植体分别是幼嫩种子、未成熟胚、成熟种子和成熟胚。在相同的诱导培养基 NBD2 上 4 种外植体愈伤组织诱导率见表 2。结果显示幼胚和成熟胚可以高频诱导产生大量愈伤组织。

将幼胚和成熟胚培养在 2 种基本培养基 NB (表 1) 和 MB (MS 大量盐, B₅ 维生素和微量元素, 其它物质同 NB) 并附加 0.2、0.5 和 2 mg·L⁻¹ 2,4-D 及 0、1 和 2 mg·L⁻¹ KT 共 11 种不同浓度组合的培养基上。1 个月后, 我们从中选出 NBD0.5 和 NBD2 为最佳诱导培养基, 它们诱导出的愈伤组织胚性强、呈淡黄色、颗粒状。2 种培养基又各有优点: NBD2 诱导的愈伤组织较大, 但略显松散; NBD0.5 诱导出的愈伤组织块略小, 但较致密, 有利

于芽的分化。

另外, 我们在基于 MS 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT 为基本培养基的基础上, 用 NBD0.5 和 NBD2 上诱导继代的愈伤组织为材料, 比较了 10 种含不同激素组合的培养基, 即 1、2 和 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 0、0.25 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 对愈伤组织分化不定芽的影响。从中筛选出 2 种比较好的分化培养基 RE1 和 RE2(表 1, 不加头孢霉素和潮霉素), 其分化率分别达到 82.8% 和 64.7% (未经部分干燥处理)。NBD0.5 来源的愈伤组织分化率高于 NBD2 来源的愈伤组织分化率。此外, 分化之前对愈伤组织进行部分干燥处理、将愈伤组织分割成约 2 mm 大小以及在分化培养基中添加山梨糖醇等措施可进一步提高分化率, 使其达到 85% - 100%。

2.2 愈伤组织继代次数对转化频率的影响

以成熟胚及成熟胚诱导的愈伤组织、幼胚及幼胚诱导的愈伤组织为受体进行农杆菌介导的转化, 结果表明, 不论成熟胚还是幼胚诱导的愈伤组织, 继代均比不继代转化频率高, 成熟胚愈伤组织又以继代 2-4 次后进行转化效率较高(表 3)。其中, 继代 4 次的愈伤组织, 抗性愈伤组织转化率(抗性愈伤数 / 侵染愈伤数)与抗性植株株系转化率(抗性株系数 / 侵染愈伤数)最高分别为 71.4% 和 47.6%(图 1A-C; 表 3)。

2.3 影响 T-DNA 转移的其它因素

从以上结果可知, 继代 4 次的成熟胚愈伤组织转化频率最高, 但存在继代次数多、所需时间长等缺点。因此

表 2 4 种外植体愈伤组织诱导率比较

Table 2 Comparison of the rate of callus induction among four explants

Types of explant	Immature embryos	Immature seeds	Mature embryos	Mature seeds
Callus percentage (%)	83.7±13.1	46.1±2.4	67.4±3.5	19.4±3.6

每个处理接种 30 个外植体, 重复 6 次

Thirty explants were inoculated in each treatment with six replicates

表 3 愈伤组织类型和愈伤组织继代次数对水稻转化率的影响

Table 3 Effect of type of calli and frequency of calli transferred on transformation efficiency by *Agrobacterium tumefaciens* in rice

Rice species and transformed genes	Type of explants	Frequency of calli transferred	Total calli (A)	No. of Hyg ^r calli (B)	Hyg ^r plants lines (C)	No. of Hyg ^r plants	Transformation efficiency B/A	C/A
Zhonghua 10	ME	0 (4 days)*	100	0	0	0	0.0	0.0
S-RAA1	MEC	0 (4 weeks)	49	4	2	37	8.2	4.1
S-RAA1	MEC	1 (8 weeks)	55	2	2	30	3.6	3.6
S-RAA1	MEC	3 (12 weeks)	87	21	18	189	24.1	20.7
S-RAA1	MEC	4 (14 weeks)	42	30	20	184	71.4	47.6
A-RAA1	MEC	4 (14 weeks)	44	22	10	74	50.0	22.7
S-RAA1	MEC	7 (24 weeks)	39	5	5	31	13.0	13.0
S-RAA1	MEC	12 (1 year)	67	18	16	78	26.9	23.9
A-RAA1	MEC	12 (1 year)	66	18	11	81	27.3	16.7
S-RAA1	IE	0 (4 days)	24	1	1	22	4.2	4.2
S-RAA1	IEC	2 (12 weeks)	93	46	36	206	49.5	38.7
S-RAA1	IEC	4 (14 weeks)	28	13	11	126	46.4	39.3
Zhonghua 11	IE	0 (4 days)	83	4	4	57	4.8	4.8
S-RAA1	IEC	1 (8 weeks)	38	20	18	176	52.6	47.4

S: 正义; A: 反义; ME: 成熟胚; IE: 未成熟胚; MEC: 成熟胚诱导的愈伤组织; IEC: 未成熟胚诱导的愈伤组织

*括号中显示被农杆菌侵染前愈伤组织或外植体在愈伤组织诱导和继代培养基上培养的时间

S: Sense; A: Antisense; ME: Mature embryos; IE: Immature embryos; MEC: Callus induced from mature embryos; IEC: Callus induced from immature embryo

*The data in parentheses showed the total time of calli or explants cultured in callus induction or sub-culture medium prior to they were infected by *Agrobacterium tumefaciens*

如何进一步提高继代次数少的愈伤组织的转化率仍有实际意义。为此以中花 10 号成熟胚诱导并继代 1 次的愈伤组织为材料, 比较了各种因素对提高转化率的影响。结果显示, 预培养基中 2,4-D 的浓度能有效改变愈伤组织转化率, 在含有 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 的 NBD2 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 的 NB D0.5 培养基上, 预培养后前者的转化率可提高 15% 以上。

农杆菌的侵染方式也影响转化率。比较 OD_{600} 0.5 和 0.8 的菌悬液, 两者对继代 1 次的愈伤组织的转化率分

别为 23.8% 和 13%, 说明 OD_{600} 值为 0.5 的菌悬液较好。共培养时, 在愈伤组织上滴加 $20 \mu\text{L}$ AMD0.5-As 液体培养基会激活农杆菌, 但在以后除菌时很难除去, 致使继代 2 次的成熟胚愈伤组织的转化频率反而由 30% 以上降到 13%。故在铺有一层滤纸的培养基上进行共培养, 是一种可行的办法。

2.4 转化植株的再生

将筛选培养 6 周、来自不同外植体的抗性愈伤组织进行

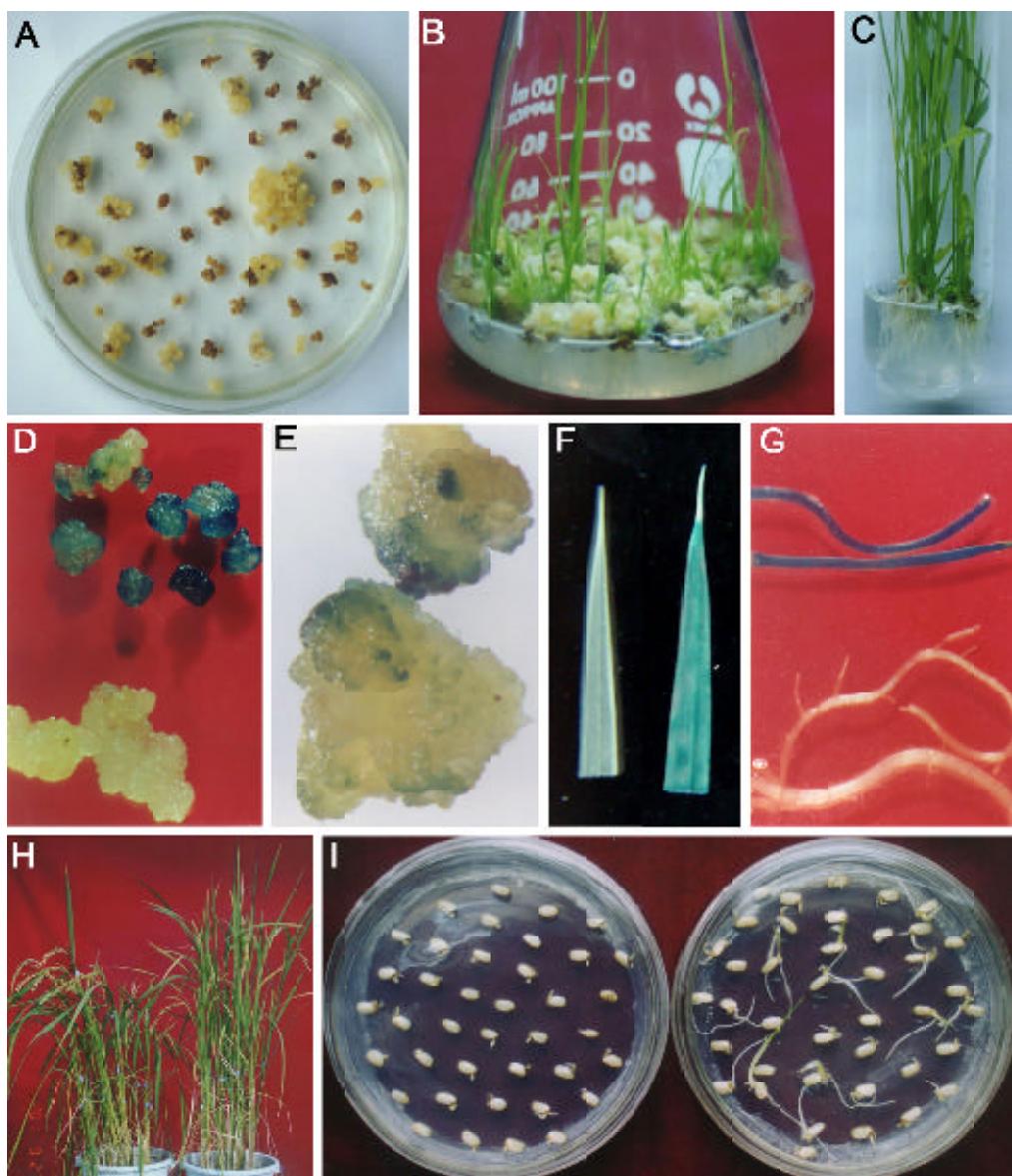


图 1
Figure 1

部分干燥处理 1 - 2 天, 且分割成 2 mm 左右的小块, 转移到 RE1-CH 培养基中用于分化不定芽。分化培养的第 6 - 7 天在黑暗条件下进行, 以后光照培养。第 11 - 12 天, 肉眼可见绿色芽点的产生, 第 15 天后将这些带有绿色芽点的愈伤组织再转移到 RE2-H 培养基上培养, 开始小苗发育(图 1B)。每块抗性愈伤组织平均获得 10 - 15 棵苗, 有些可达 24 - 56 棵或更多。未分化的愈伤组织经第 2 次部分干燥处理及在 RE1-CH 和 RE2-H 培养基上再次预分化和分化后, 再生植株获得率可达 100%。

待小苗长至 5 - 6 cm 时转移到 1/2 MS NMH 培养基上生根(图 1C), 得到 T₀ 植株, 并将这些植株移栽到温室中可正常开花结实(图 1H)。共获得 121 个转正义基因独立株系和 21 个转反义基因株系。

2.5 GUS 组织化学检测

筛选 6 周的潮霉素抗性愈伤组织, 经 GUS 组织化学检

测, 其 GUS 阳性率为 77% - 100%, 且大多染色范围大、颜色较深(图 1D)。而在 RE1-CH 培养基上培养 2 周、未分化出芽的愈伤组织, 其蓝色斑点较稀疏(图 1E), 但这些未分化的愈伤组织仍有分化出阳性植株的潜力。转基因 T₀ 植株幼苗的叶片切块和根段的 GUS 组织化学检测结果表明, 大多数株系均被染成蓝色(图 1F, G)。从 50 个独立克隆的 GUS 活性检测结果发现, 如果整个愈伤组织被染成均匀的蓝色, 那么由该愈伤组织分化的植株大都 GUS 检测呈阳性。然而, 在由蓝色斑点少的愈伤组织块再生的植株中, 只有少数植株具有 GUS 活性。

2.6 转基因植株的 PCR 鉴定和 T₁ 代植株的潮霉素抗性检测

为了进一步鉴定潮霉素抗性及 GUS 阳性植株中外源目的基因的存在, 我们对 T₀ 再生植株及其 T₁ 代植株进行了 PCR 鉴定。从再生植株和萌发 2 周的 T₁ 代植株上分别

←

- 图 1 中花 10 号成熟胚诱导的愈伤组织与农杆菌 EHA105(含质粒 pUN1301/OsRAA1)共培养后的转化细胞和再生植株**
- (A) NB0.5-CH₂ 培养基上的抗潮霉素细胞克隆生长良好(呈黄色), 而非转化细胞死亡(呈褐色);
 (B) 再生植株, 筛选细胞经预分化后在分化培养基上培养 2 周时;
 (C) 植株生根;
 (D) 抗潮霉素愈伤组织的 GUS 表达, 上面为转基因克隆, 下面为对照;
 (E) RE1-CH 培养基上未分化抗性愈伤组织的 GUS 表达;
 (F) 一个转化子叶片的 GUS 表达, 用 X-Gluc 染色的转基因植株的叶片切段(右)和非转基因植株的叶片切段(左);
 (G) 一个转化子根的 GUS 表达, 上面为转基因植株, 下面为对照;
 (H) 转正义(右)和反义基因(左)的植株生长良好, 并开花结实;
 (I) T₁ 代植株的抗潮霉素检测, 未转基因植株的种子(左)和转基因植株的种子(右)置于 MS₀-H 筛选培养基中, 7 天后照相

Figure 1 Mature embryo-derived calli of *Oryza sativa* ‘Zhonghua 10’ that had been co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 containing plasmid pUN1301/OsRAA1, and transgenic cells and plants derived from the calli

- (A) Hygromycin-resistant colonies of cells grew well (yellow color) on NB0.5-CH₂ that initial calli come from four times of sub-culturing while the non-transgenic calli died (brown color);
 (B) Plant regeneration, the photograph was taken two weeks after pre-regenerated cells had been transferred to regeneration medium;
 (C) Rooting of plantlets;
 (D) Expression of GUS in hygromycin-resistant calli, transgenic lines (upper), control (lower);
 (E) Expression of GUS in hygromycin-resistant calli cultured on medium RE1-CH;
 (F) Expression of GUS in the leaf of a transformant, segments of leaves of a transgenic plant (right) and a non-transgenic plant (left) were stained with X-Gluc;
 (G) Expression of GUS in the root of a transformant, transgenic lines (upper), control (lower);
 (H) Sense (right) and anti-sense (left) transgenic plants grew well and produced flowers and seeds;
 (I) Test of T₁ progeny for resistance to hygromycin, seed from a non-transgenic (left) and a transgenic (right) plant were plated on MS₀-H selective medium, and the photograph was taken seven days later.

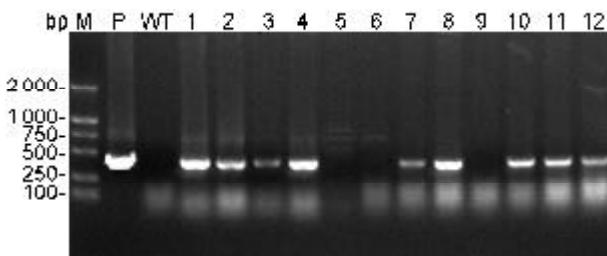


图 2 转 OsRAA1 植株的 PCR 鉴定

M: DL2000 marker; P: 以质粒 pUN1301/OsRAA1 为模板扩增出 483 bp 长的目的条带; WT: 以野生型植株的基因组 DNA 为模板; 1-12: 以转基因 1-12 株系 DNA 为模板

Figure 2 PCR assay of OsRAA1 transgenic rice plants

M: DL2000 marker; P: Plasmid pUN1301/OsRAA1 as template; WT: Genomic DNA of wild-type plants as template; 1-12: Genomic DNA from line 1 to 12 of transgenic plants as templates

剪取 3-4 cm 长的叶片, 按 Dellaporta 等 (1983) 的方法提取总 DNA 为模板, 用设计好的一对引物进行 PCR 扩增。结果见图 2。在检测的 12 个株系中只有 3 个株系无外源插入基因, 其余都可扩增出 483 bp 长的目的产物, 说明外源基因已整合到大部分转基因株系的基因组中。

此外, 为了检验外源基因在后代中的遗传稳定性, 通过观察 T_1 代种子在含 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素的 MS₀-H 培养基上是否萌发, 鉴定出潮霉素抗性与敏感性植株(图 1)。大多数株系表现为 3:1 的抗感分离比。这些 Hyg 阳性植株同时还表现为 GUS 阳性, 经 PCR 检测其基因组中含有目的基因。本实验室用该转化体系转化的其它基因经 Southern 杂交实验证明其大多数转化株系为单拷贝(Xu et al., 2005; Zhuang et al., 2006; Jiang et al., 2007)。

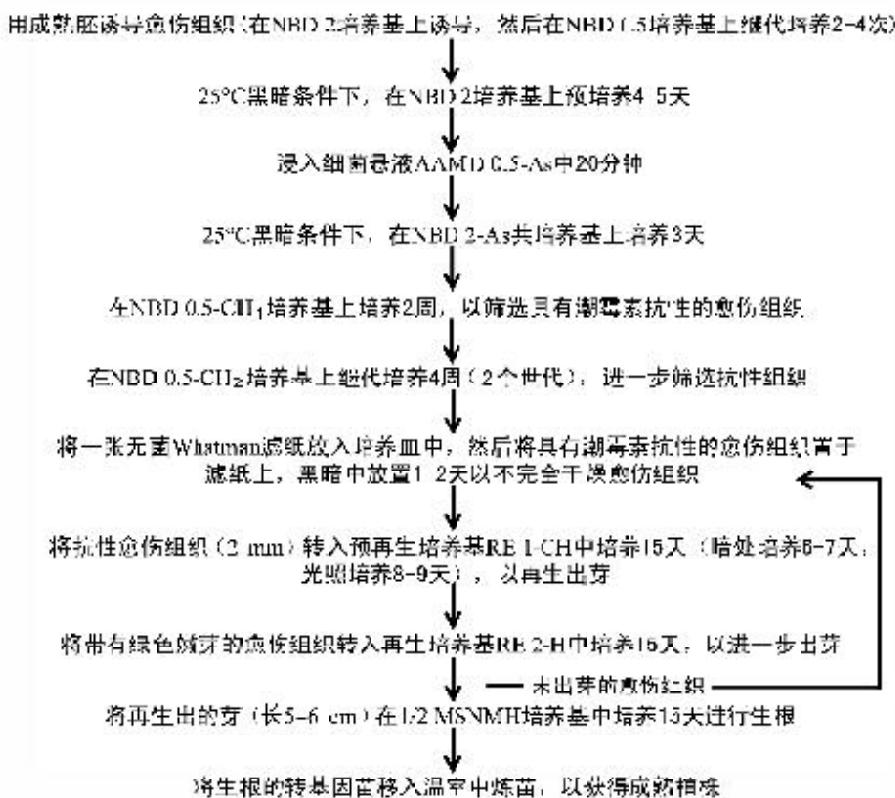


图 3 农杆菌介导的水稻成熟胚高效转化程序

Figure 3 Protocol of high-efficiency transformation of rice using mature embryo-derived calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

3 讨论

高效水稻转化体系可为水稻功能基因组研究、T-DNA插入突变体库创建和分子遗传育种搭建良好的技术平台。本套转化体系是经过对组织培养诱导、继代培养基的筛选、预分化和分化培养基的筛选、农杆菌侵染前愈伤组织的继代次数以及预培养培养基等的研究而建立起来的。其特点: 一是使用成熟胚诱导的愈伤组织作为转化的受体材料, 取材方便; 二是愈伤组织转化频率高且株系再生频率也高。这与成熟胚愈伤组织诱导和继代培养以及转化过程中所使用的培养基按需适时调整 2,4-D 的浓度等因素均有关。本转化体系具体操作步骤见图 3。

建立水稻成熟胚高频率植株再生体系是转化的第一步。本套再生体系中, 诱导培养基 NBD2 中附加较高浓度的 2,4-D, 有利于提高愈伤组织的诱导率和愈伤生长量; 而继代培养基(NBD0.5)中附加低浓度的2,4-D, 可使愈伤组织生长致密且有利于后续芽的分化。如果附加高浓度($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 2, 4-D, 容易使愈伤组织外形松散、褐化, 细胞液泡化程度增加, 失去分化芽的能力(叶松青等, 2001)。在转化程序中, 愈伤组织预培养及与农杆菌共培养等培养基使用 NBD2, 可能使水稻愈伤组织细胞成为农杆菌的良好受体细胞, 从而有利于后者的侵染; 而筛选培养基使用 NBD0.5, 有利于抗性株系的高频率再生。此外, 在分化培养基的筛选和植株再生过程中, 我们综合前人成功的经验, 采取如在预分化和分化培养基中添加山梨糖醇、提高固化剂浓度 (Rashid et al., 1996; 黄健秋等, 2000)、愈伤组织分化前进行 1-2 天的部分干燥处理 (Masayoshi and Takayasu, 1992) 以及分割愈伤组织块(约 2 mm)(黄健秋等, 2000)等措施, 可进一步提高再生频率, 使之高达 80% - 100%。

选择合适的起始材料是影响水稻农杆菌转化的重要因素。大多数研究者采用幼胚作为起始材料 (Hiei et al., 1994, 1997; Smith and Hood, 1995; Aldemita and Hodges, 1996; 刘巧泉等, 1998; Tyagi and Mohanty, 2000; 黄健秋等, 2000) 并获得成功, 但幼胚材料的获得受一定条件限制。也有部分研究者用成熟胚诱导的愈

伤组织作为起始材料并成功转化(Rashid et al., 1996; 章冰和卫志明, 1999; 黄健秋等, 2000), 但转化率不高。我们以剥取的成熟胚诱导并继代 2-4 次的愈伤组织, 预培养 4-5 天, 作为转化受体材料, 成功获得转化, 愈伤组织转化率为 71.4%, 经第 1 次分化再生, 抗性株系转化率为 47.6% (表 3)。未再生的抗性愈伤组织, 经第 2 次干燥和分化, 抗性株系转化率可提高到 70% 以上。二次干燥和分化能提高抗性株系转化率, 这是本转化体系有别于其它转化体系的一个特点。

到目前为止, 我们利用该套改进的水稻转化系统成功地将多个新克隆的基因转化到水稻中, 为这些基因的功能研究提供了良好的技术平台。这套体系对于旱稻和其它水稻品种的转化(Chen et al., 2007)均适用, 对禾本科其它植物的转化也具有借鉴和参考价值。

致谢 实验过程中得到中国科学院植物研究所徐云远研究员的指导和帮助, 在此致谢。

参考文献

- 高东迎, 何冰, 孙立华 (2007). 水稻转座子研究进展. 植物学通报 **24**, 667-676.
- 黄健秋, 卫志明, 安海龙, 徐淑平, 章冰 (2000). 根癌农杆菌介导的水稻高效转化和转基因植株的高频率再生. 植物学报 **42**, 1172-1178.
- 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 顾铭洪 (1998). 一种根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统. 植物生理学报 **24**, 259-271.
- 叶松青, 储成才, 曾守云, 唐祚舜, 王力, 赵世民, 田文忠 (2001). 提高水稻转化频率的几个因素的研究. 遗传学报 **28**, 933-938.
- 章冰, 卫志明 (1999). 根癌农杆菌介导的水稻转化及转基因 R1 植株表型特征. 植物生理学报 **25**, 313-320.
- 朱至清, 孙敬三 (1975). 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学 **5**, 484-490.
- Aldemita RR, Hodges TK (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. *Planta* **199**, 612-617.
- Chen H, An R, Tang JH, Cui XH, Hao FS, Chen J, Wang XC

- (2007). Overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. *Mol Breed* **19**, 215-225.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JO** (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**, 19-21.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968). Plant cell culture 1: nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**, 151-158.
- Ge L, Chen H, Jiang JF, Zhao Y, Xu ML, Xu YY, Tan KH, Xu ZH, Chong K** (2004). Overexpression of OsRAA1 causes pleiotropic phenotypes in transgenic rice plants, including altered leaf, flower, and root development and root response to gravity. *Plant Physiol* **135**, 1502-1513.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T** (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**, 205-218.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**, 271-282.
- Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Scheffer J** (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **163**, 181-187.
- Jefferson RA** (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**, 387-405.
- Jiang JF, Li JH, Xu YY, Han Y, Zhao GX, Lou YG, Xu ZH, Chong K** (2007). RNAi knockdown of *Oryza sativa* root meander curling gene led to altered root development and coiling which were mediated by jasmonic acid signaling in rice. *Plant Cell Environ* **30**, 690-699.
- Masayoshi T, Takayasu H** (1992). Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Rep* **11**, 550-553.
- Murashige T, Skoog F** (1962). Advanced medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**, 473-479.
- Rashid H, Kinya Y, Toriyama K, Hinata K** (1996). Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice. *Plant Cell Rep* **15**, 727-730.
- Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bes M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PB, Rueb S, Deiseny M, Guiderdoni E** (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet* **106**, 1396-1408.
- Smith RH, Hood EE** (1995). *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci* **35**, 301-309.
- Tyagi AK, Mohanty A** (2000). Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Sci* **158**, 1-18.
- Xu ML, Jiang JF, Ge L, Xu YY, Chen H, Zhao Y, Bi YR, Wen JQ, Chong K** (2005). *FPF1* transgene leads to altered flowering time and root development in rice. *Plant Cell Rep* **24**, 79-85.
- Zhuang XL, Jiang JF, Li JH, Ma QB, Xu YY, Xue YB, Xu ZH, Chong K** (2006). Over-expression of OsAGAP, an ARF-GAP interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. *Plant J* **48**, 581-591.

Improved High-efficiency System for Rice Transformation Using Mature Embryo-derived Calli

Hui Chen^{1,2}, Yuan Zhao¹, Kang Chong^{1*}

¹Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

²College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China

Abstract Rice has been transformed via *Agrobacterium* transfection with use of mature embryo-derived calli, but the transformation efficiency has remained relatively low in general. In this study, we optimized different factors affecting transformation and established a highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium* using mature embryo-derived calli from two japonica cultivars (Zhonghua 10, 11). The transformation was performed with *A. tumefaciens* strain EHA105 harboring the plasmid pUN1301/OsRAA1, *GUS* used as the reporter gene and *HPT* as the selectable marker gene. First, we established a high-frequency regeneration system for rice, defined NBD2 (NB+2 mg·L⁻¹ 2,4-D) as callus induction medium, NBD0.5 as subculture medium, and RE1 (MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.25 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.2 mg·L⁻¹ ZT) and RE2 (MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ KT+0.2 mg·L⁻¹ ZT) as regeneration medium. Second, factors such as the selection of explants, the pre-culture medium and the subculture times were shown to affect the efficiency of T-DNA delivery. The transformation efficiency using the optimized method was increased to 70%, which was measured either by counting the number of hygromycin-resistant calli or the number of transgenic plants.

Key words *Agrobacterium*-mediated transformation, mature embryo-derived callus, rice (*Oryza sativa L.*)

Chen H, Zhao Y, Chong K (2008). Improved high-efficiency system for rice transformation using mature embryo-derived calli. *Chin Bull Bot* 25, 322-331.

* Author for correspondence. E-mail: chongk@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)

