

影响根癌农杆菌介导的高效水稻遗传转化的相关因素分析*

黄红梅^{1,2}, 杨永智¹, 张治国¹, 宛淑艳¹, 郭蔼光², 吴金霞¹, 路铁刚¹

(1 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以水稻基因组测序品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)为材料, 对根癌农杆菌介导的水稻转化系统进行了优化。结果表明, 水稻种子经质量分数2.5%的次氯酸钠灭菌30 min后, 愈伤组织诱导率最高; 所获得的胚性愈伤组织经过6~7 d的继代培养后转化率达到95%; 感染液菌浓度OD₆₀₀值为0.145~0.190时, 转化效率高; 将抗性愈伤组织进行7 d的暗培养可使分化效率提高到85%。应用本转化系统已经获得了大量的转化体, GUS表达率达到30%, 并且3个月即可获得转化植株。

[关键词] 根癌农杆菌; 水稻; 遗传转化

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0004-05

水稻是单子叶植物基因组研究的模式植物^[1], 近年来水稻基因组研究取得了很大进展, 构建了遗传图谱和物理图谱, 完成了籼稻^[2]和粳稻^[3]的全基因组草图测序, 以及第1号^[4]和第4号染色体的精细测序^[5], 并对第10号染色体的结构进行了详细分析^[6]。在此基础上, 各个实验室大规模、系统地进行了水稻功能基因研究, 其中普遍应用的研究手段是基因标签技术。

基因标签技术包括T-DNA和转座子标签, 创建大量的基因标签体是功能基因研究的材料平台。而根癌农杆菌介导的水稻转化是水稻基因标签技术中的重要步骤之一。本研究对该步骤进行了改良, 完善了根癌农杆菌介导的水稻转化方法, 以期为水稻功能基因研究提供丰富材料, 为水稻重要农艺性状的改良开辟途径。

1 材料与方法

1.1 水稻愈伤组织的诱导

水稻愈伤组织的诱导参照Hiei等^[7]的方法。将日本晴水稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)种子去壳, 每200粒种子为1个处理, 用体积分数75%乙醇灭菌5 min, 再用质量分数2.5%的次氯酸钠分别处理25, 30, 37, 40 min。然后用无菌水冲洗6~8次, 于诱导培养基上28℃避光培养, 30 d后将愈伤组织进

行继代培养, 继代培养基中2, 4-D为2.0 mg/L, 其余成分同诱导培养基。

1.2 农杆菌转化愈伤组织

1.2.1 菌株与载体 选用EHA 105超毒力菌株, 载体为增强子捕获载体pFX-E24-2-15R, 载体上带有GUS报告基因, 35S的CaMV启动子序列和潮霉素选择标记基因(HYG)。载体经电击法转入农杆菌菌株EHA 105, 见图1。

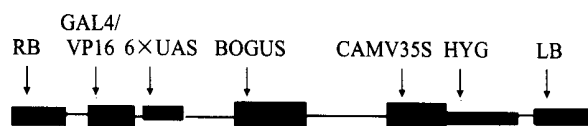


图1 载体pFX-E24-2-15R上的T-DNA片段

RB为T-DNA右边界; GAL4/VP16为酵母转录激活子GAL4 DNA结合区与单纯疱疹病毒VP16激活区的融合基因; 6xUAS为6个重复的上游激活序列; BOGUS为细菌OZ葡(萄)糖苷酸酶基因; CAMV35S是35S的花椰病毒启动子; HYG是选择标记基因; LB是T-DNA左边界。

Fig. 1 Diagram of T-DNA in pFX-E24-2-15R vector. RB is the right border of T-DNA; GAL4/VP16 is a fusion gene of yeast transcriptional activator GAL4 DNA-binding domain with the Herpes simplex virus VP16 activation domain; 6xUAS is upstream activator sequence with six repeats; BOGUS is Bacillus OZ glucuronidase gene; CAMV35S is 35S promoter of cauliflower mosaic virus; HYG is a selection marker gene; LB is the left border of T-DNA.

* [收稿日期] 2004-03-22

[基金项目] 国家863计划项目(2001AA 225051)

[作者简介] 黄红梅(1978-), 女, 江西新余人, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。

[通讯作者] 路铁刚(1964-), 男, 河北衡水人, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物功能基因组学研究。E-mail: tiegang@caas.net.cn

1.2.2 农杆菌的培养 用AB培养基+ 氯霉素(chl)25 mg/L + 利福平(rif)20 mg/L + 乙酰丁香酮(A S) 20 mg/L 进行培养,在20℃下培养5~6 d。

1.2.3 农杆菌的活化 用无菌勺子轻轻刮下农杆菌,放入AAM液体培养基中,在80 r/min,27℃下摇荡培养4 h。培养基中加有2 mg/L 2,4-D,0.7 g/L 脯氨酸,20 mg/L 的AS。

1.2.4 转化 将挑好的胚性愈伤组织放入锥形瓶,每瓶300块愈伤组织,然后将菌液倒入另一锥形瓶中,并在菌液中加入含有50 mg/L 乙酰丁香酮的AAM培养基,设计的5个处理OD₆₀₀值分别为0.120,0.145,0.158,0.190,0.195。然后将不同浓度的菌液倒入愈伤组织中,用手轻摇几分钟,感染15 min。再吸干菌液,将愈伤组织放在无菌滤纸上干燥,移至共培养基上27℃共培养3~4 d后,将愈伤

组织转移到选择培养基上培养15 d,然后统计转化率,转化率用产生抗性愈伤组织的愈伤块数/300表示。

1.3 转化体的获得

将共培养的愈伤组织转出,无菌水漂洗3~4次,再用N₆培养基+50 mg/L 头孢霉素在室温下100 r/min 摇洗1~2 h,洗2遍,用真空泵吸干菌液,放在滤纸上。将吸干的愈伤组织转入N₆选择培养基上,27℃下暗培养20 d后,继代1次。将新长出的抗性愈伤组织转移到N₆预分化培养基上,分别进行28℃、暗培养7 d和28℃、光照下培养7 d两个处理,同时将两个处理的愈伤组织转移到N₆分化培养基上,在28℃、光照12 h/d条件下培养,待分化出完整小苗后转入壮苗培养基MS中,炼苗并移栽。水稻转化所用培养基见表1(试剂均购自北京化工厂)。

表1 水稻转化所用培养基

Table 1 Media used in rice transformation procedure

培养基 Media	组成成分 Composition
愈伤诱导培养基 Callus induction medium	MS基本培养基,100 mg/L 肌醇,300 mg/L 水解酪蛋白,30 g/L 蔗糖,2.5 g/L 植物胶,4.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸,2.0 g/L L-脯氨酸,pH 5.8 MS basal,100 mg/L inositol,300 mg/L casein hydrolysate,30 g/L sucrose,2.5 g/L Phytagel,4.0 mg/L 2,4-D,2.0 g/L L-proline,pH 5.8
N ₆ 培养基 N ₆ medium	N ₆ 基本培养基,100 mg/L 肌醇,300 mg/L 水解酪蛋白,500 mg/L L-脯氨酸,30 g/L 蔗糖 N ₆ basal,100 mg/L inositol,300 mg/L casein hydrolysate,500 mg/L L-proline,30 g/L sucrose
共培养培养基 Co-culture medium	N ₆ 培养基,2.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸,10 g/L 谷氨酸,20 mg/L 乙酰丁香酮,2.5 g/L 植物胶,pH 5.2 N ₆ medium,2.0 mg/L 2,4-D,10 g/L glucose,20 mg/L acetosyringone,2.5 g/L Phytagel,pH 5.2
选择培养基 Selection medium	N ₆ 培养基,2.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸,50 mg/L 潮霉素,500 mg/L 头孢霉素,2.5 g/L 植物胶,pH 5.8 N ₆ medium,2.0 mg/L 2,4-D,50 mg/L hygromycin,500 mg/L cefotaxime,2.5 g/L Phytagel,pH 5.8
预分化培养基 Predifferentiation medium	N ₆ 培养基,5.0 mg/L 脱落酸,2.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤,1.0 mg/L 奈乙酸,50 mg/L 潮霉素,500 mg/L 头孢霉素,2.5 g/L 植物胶,pH 5.8 N ₆ medium,5.0 mg/L ABA,2.0 mg/L BA,1.0 mg/L NAA,50 mg/L hygromycin,500 mg/L cefotaxime Phytagel,pH 5.8
分化培养基 Differentiation medium	N ₆ 培养基,3.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤,0.5 mg/L 奈乙酸,50 mg/L 潮霉素,500 mg/L 头孢霉素,2.5 g/L 植物胶,pH 5.8 N ₆ medium,3.0 mg/L 6-BA,0.5 mg/L NAA,50 mg/L hygromycin,500 mg/L cefotaxime,2.5 g/L Phytagel,pH 5.8

1.4 GUS 染色分析

切取T₀代转化体的叶片、种子器官组织浸泡于染色液中,在37℃下反应12~16 h,弃去染色液,用体积分数95%的酒精75℃下脱色,在解剖显微镜下观察拍照。染色液组成为50 mmol/L 的磷酸钠盐缓冲液(pH 7.0),10 mmol/L EDTA,体积分数0.1% TritonX-100,1 mg/mL X-Gluc,0.1 mmol/L 铁氰化钾,0.1 mmol/L 亚铁氰化钾,体积分数20%甲醇。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对愈伤组织诱导率的影响

胚性愈伤组织是成功转化的基本材料。为了保证灭菌彻底,又不影响种子的萌发和产生愈伤,一定要选择合适的种子灭菌时间。

表2 不同灭菌时间对水稻成熟胚愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different sterilization time on the frequency of callus induction from rice mature embryos

灭菌时间/min Sterilization time	愈伤组织诱导率/% The frequency of induction
40	77
37	93.6
30	97.3
25	96.3

由表2可知,种子灭菌30 min时愈伤组织诱导率最高,而40 min时愈伤组织诱导率大大降低,大部分种子不能萌发,可能是胚已被次氯酸钠破坏失活。观察发现,灭菌25 min时次氯酸钠对种子萌发力没有影响,因而种子萌发力强,萌发消耗更多养分,部分抑制愈伤组织生长;在灭菌40和37 min时,

愈伤颗粒比较小, 侵染时易褐死, 不利于转化。而灭菌 30 min 时愈伤颗粒大小约 3 mm, 适合于转化, 因此灭菌时间 30 min 的愈伤组织诱导效果最好。

2.2 愈伤组织继代培养时间对转化率的影响

本试验将诱导的愈伤组织继代培养后发现, 愈伤组织表面变得光滑, 质地更为致密, 颗粒性好。试验证明: 继代培养 6~7 d 的愈伤组织最适合于转化, 转化效率达到 95%; 继代培养小于 6 d 时, 愈伤组织表面粗糙, 愈伤颗粒小, 转化后形成的抗性愈伤少, 转化效率低; 继代时间大于 7 d 时, 愈伤组织逐渐变软, 发粘或呈水渍状, 转化后易褐化死亡, 转化效率降低。

2.3 农杆菌浓度对转化率的影响

农杆菌浓度直接影响转化率。表 3 结果表明, OD_{600} 值为 0.145~0.190 时转化率基本保持稳定, 约为 79%, 如图 2, 选择培养时无农杆菌污染; OD_{600} 值超过 0.190 时死亡愈伤数增多, 并且选择培养时出现农杆菌污染, 大量的农杆菌覆盖在愈伤组织上, 抑制其生长; OD_{600} 值为 0.120 时, 虽然转化率为

76.2%, 但每个愈伤组织块产生的抗性愈伤数很少。

表3 菌液浓度对转化率的影响

Table 3 Influence of bacteria concentration on transformation efficiency

OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value	转化率/% Transformation efficiency
0.120	76.2
0.145	79.2
0.158	77.6
0.190	78.1
0.195	70.6

2.4 愈伤组织分化培养的效果

研究表明: 将选择培养基上的抗性愈伤组织转到分化培养基上, 然后放置在黑暗下培养 7 d, 再转到新的分化培养基上光照培养, 约 10 d 后分化成苗, 如图 3 所示, 分化效率为 85%。而直接在光照下预分化培养的愈伤组织大部分变绿后逐渐褐化, 不能分化。由于预分化培养基中含有 ABA, ABA 见光分解, 先在黑暗下培养 7 d, 可以避免 ABA 分解, 促使愈伤组织快速转入分化生理状态, 提高分化效率。

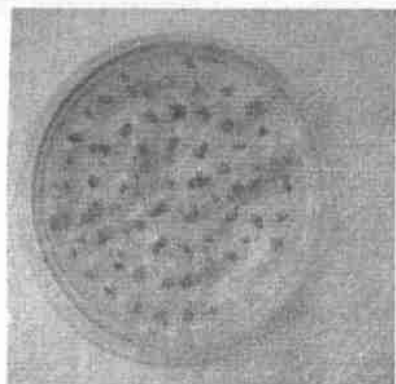


图2 来源于胚性愈伤的抗性愈伤

Fig. 2 Hygromycin resistant calli derived from embryogenic calli

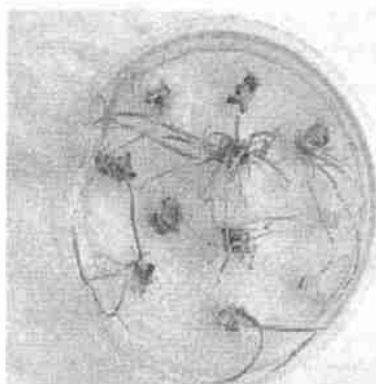
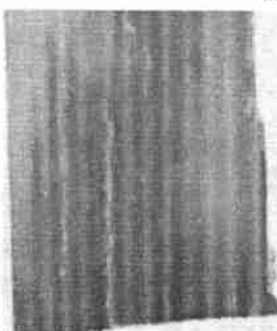


图3 抗性愈伤分化成苗(左)和转化植株(右)

Fig. 3 Shoots from resistant calli (left) and transformants (right)



胚
Embryo



叶
Leaf



胚乳和胚
Endosperm and embryo

图4 在 T₀ 代转化体种子和叶片 GUS 活性的组织化学染色

Fig. 4 Histochemical staining of GUS activity in seeds and leaves of T₀ transformants

2.5 转化体的初步分析

GU S 染色分析试验显示, *GUS* 基因已在水稻的叶片、根、颖壳、种皮、胚及胚乳各个部位表达, 如图4, 在10 000个独立的转化体中染色阳性率达到30%, 表明T-DNA 已经稳定整合到水稻基因组中, 为有效分离水稻的基因启动子元件和基因调控序列打下基础。

3 讨 论

3.1 种子灭菌时间对愈伤组织诱导率的影响

种子的灭菌处理效果直接影响愈伤诱导率, 进而影响转化效率。获得高质量的愈伤组织是转化的重要基础。但在转化体系研究中有关灭菌时间对愈伤诱导率的影响报道极少。本研究结果表明, 最佳的灭菌时间为30 min。此研究结果对于大规模创建转化体具有指导意义。

3.2 愈伤组织继代培养时间对转化率的影响

愈伤组织经过多代培养后易产生体细胞突变, 不利于转化体的筛选; 同时, 多代培养后愈伤组织衰老死亡, 降低转化效率。本研究曾将未经继代培养的愈伤组织进行转化, 发现转化效率也很低, 这说明细胞的周期状态影响转化效率。已有研究表明^[8], 当愈伤组织处于细胞周期S 期和G₂ 期的细胞比例最高时, 转化效率最高, S 期是细胞DNA 复制期, 此时转化有利于转入的T-链转变成双链, 增加遗传和整合的稳定性。本研究结果表明, 经过继代培养6~7 d 后转化率高达95%。经过继代培养后, 愈伤组织的胚性细胞比例提高, 外观表现为组织表面光滑, 质地致密, 这类胚性细胞处于较好的脱分化状态, 有较强的分裂能力和再生能力, DNA 合成能力强, 有利于T-DNA 整合, 因而提高了转化效率。

3.3 农杆菌浓度对转化效率的影响

农杆菌转化是细菌与植物相互作用的过程, 植物在转化过程中产生的许多蛋白质分子影响T-DNA 整合^[8]。宿主细胞的生理状态和发育进程可影响农杆菌的转化, 被农杆菌侵染后的愈伤组织经过共培养恢复活力, 并稳定T-DNA 整合。试验中观察发现: 农杆菌浓度太低时侵染几率小, 每个愈伤组织块产生的抗性愈伤数极少, 在一个愈伤组织块不同

部位产生的抗性愈伤组织形成不同的转化体, 因而产生的转化体总数减少; 而浓度太高时, 愈伤组织很容易被过度侵染, 细菌生长旺盛, 覆盖愈伤组织, 使其生长受到抑制, 共培养后无法恢复活力, 在选择培养时大多数褐化死亡。

3.4 愈伤组织的分化培养

愈伤组织从脱分化状态转变为分化状态, 进一步分化成苗。ABA 可以促使愈伤组织转变为分化状态, 并且改善愈伤组织的生长状态, 使愈伤组织的结构变得致密, 颜色变为乳白色, 表面干爽, 分化能力明显提高。本研究结果表明: 在黑暗下预培养7 d, 避免ABA 见光分解, 使ABA 的作用效果达到最佳, 分化率达到85%, 高于易自力等^[9]的65.1% 分化率, 并加速了愈伤组织分化速度。

3.5 转化体的初步分析

报告基因可以确定转化体与非转化体, 并且检测外源基因在受体内的表达情况。本试验所用载体为增强子捕获载体, 即当弱启动子的*GUS* 报告基因插入到水稻基因增强子附近时, *GUS* 基因才能够表达, 从而捕获到水稻增强子。由于增强子可以在其作用距离范围内的任何方向增强*GUS* 基因表达, 因而捕获效率高。转化体的GU S 染色分析表明: 30% 转化体为阳性。没有GU S 染色反应的植株, 可能是由于基因插入位置、*GUS* 基因的缺失或基因沉默所致; 植物中不同的基因在不同生长阶段表达, *GUS* 基因表达也会随之变化。

农杆菌介导的基因转化技术是水稻基因转化的首选方式。农杆菌介导转化方法的优点是转化效率高, 转基因重排比例少, 插入拷贝数少, 单拷贝数植株比例高。影响农杆菌转化效率的因子有菌株类型、水稻基因类型、培养基成分组成、组织培养条件等。不同水稻品种需要不同的转化体系条件, 本研究通过对日本晴水稻的转化条件的研究, 优化了日本晴品种的转化体系, 只需3个月即可获得转化植株, 较李美茹等^[10]报道的4个月大为缩短。Hirochika等^[11]报道, 组培会激活Tos 17等的水稻内源转座子, 造成体细胞突变。本研究建立的转化体系成本低、周期短, 从而可降低体细胞突变频率, 生产适用性和重复性强。

[参考文献]

- [1] Shimamoto K, Koyozuka J. Rice as a model for comparative genomics of plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2002, 53: 399-419.
- [2] Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. *Science*, 2002, 296: 79-92.

- [3] Goff S A, Riche D, Lan T H, et al A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) [J]. Science, 2002, 296: 92- 100
- [4] Sasaki T, Matsumoto T, Yamamoto K, et al The genome sequence and structure of rice chromosome 1 [J]. Nature, 2002, 420: 312- 316
- [5] Feng Q, Zhang Y, Hao P, et al Sequence and analysis of rice chromosome 4 [J]. Nature, 2002, 420: 316- 320
- [6] Rice Chromosome 10 Sequencing Consortium. In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10 [J]. Science, 2003, 300: 1566- 1569
- [7] Hiei Y, Ohta T, 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]. Plant J, 1994, 6: 271- 282
- [8] Stanton B, Gelvin A. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 223- 256
- [9] 易自力, 曹守云, 王 力, 等 提高农杆菌转化水稻频率的研究 [J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 352- 358
- [10] 李美茹, 李洪清 简单高效的根癌农杆菌介导的水稻基因转化方法 [J]. 实验生物学报, 2003, 36, (4): 289- 294
- [11] Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, et al Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7783- 7787

Analysis of factors influencing highly efficient *Agrobacterium* mediated rice transformation

HUANG Hong-mei^{1,2}, YANG Yong-zhi¹, ZHANG Zhi-guo¹, WAN Shu-yan¹,
GUO Ai-guang², WU Jin-xia¹, LU Tie-gang¹

(1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China;

2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The rice transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was optimized by using *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cultivars, which is the material of rice genome sequencing. The main results were as following: The frequency of callus induction is the highest when seeds sterilized in 2.5% sodium hypochlorite solution for 30 minutes; The transformation efficiency is the highest when embryogenic calli are subcultured for 6-7 days; the OD₆₀₀ = 0.145-0.190 of bacteria concentration is the best for callus transformation; with the 7-day cultivation in dark, the differentiation efficiency of the resistant calli can be improved to 85%. A lot of transformants have been obtained by using the transformation system in three months. *GUS* gene expression frequency is up to 30%.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; *Oryza sativa* L.; genetic transformation