

提高农杆菌介导转化水稻效率的因素

李双成 王世全 尹福强 邹良平 起登凤 江 洪 李 平*

(四川农业大学 水稻研究所, 四川 温江 611130; * 通讯联系人, E-mail: liping@cngk.com)

Some Factors Affecting *Agrobacterium*-Mediated Transformation Frequency in Rice

Li Shuang-cheng, Wang Shi-quan, Yin Fu-qiang, Zou Liang-ping, Qi Deng-feng, Jiang Hong, Li Ping*

(Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; * Corresponding author, E-mail: liping@cngk.com)

Abstract: Several important factors affecting rice transformation mediated by *Agrobacterium* were investigated with three indica and two japonica rice varieties. Co-transformation with *Agrobacterium* strains AGL1 and EHA 105, and by re-suspending the strains with NB culture media before transformation could improve the resistant calli rate significantly. Because of distinct influence on both the resistant calli rate and the differentiation rate, doubling the agar powder and being blew on the worktable for 4 h were considered as suitable approaches for desiccation culture. Adding DMSO or proline into the differentiation media, and NAA to the rooting media could, to some extent, improve the regeneration rate and the surviving rate, respectively. Many useful transgenic plants identified by PCR and Dot-blotting were obtained by using this protocol.

Key words: rice; *Agrobacterium*-mediated transformation; co-transformation; desiccation culture; differentiation; rooting

摘 要: 以 3 个籼稻品种和 2 个粳稻品种为对象, 对农杆菌转化水稻过程中影响转化效率的因素进行了研究。结果表明, 菌株 AGL1 和 EHA105 按一定比例混合共转化和转化前菌体重悬对抗性愈伤率有显著影响; 琼脂粉加倍和超净工作台上风干 4 h 的方法因能明显提高抗性愈伤率和分化率而被认为是最适合的干燥培养方式; 分化培养基中加入二甲亚砜(DMSO)或脯氨酸(Pro)可以提高分化率; 壮苗时加入适量的 NAA 有利于壮根并提高移栽成活率。应用此农杆菌转化系统, 获得了一批经 PCR 和点杂交鉴定的转基因植株。

关键词: 水稻; 农杆菌转化法; 共转化; 干燥培养; 分化; 生根

中图分类号: Q943.2; S336; S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)03-0231-07

自 1983 年 Zambryski 等利用农杆菌转化法获得首例转基因烟草以来, 农杆菌转化法得到了很大的发展。特别是 Chan 等^[1]、Hiei 等^[2]、Rashid 等^[3]、翟文学等^[4]利用此方法分别在粳稻和籼稻上获得成功, 有力地证实了农杆菌转化水稻的可行性和优越性。然而, 由于水稻材料间的遗传差异大, 总体而言, 转化效率不高。如何建立一个有效、稳定的转化系统一直是近年来水稻基因工程研究中关注的问题。刘巧泉等^[5]、叶松青等^[6]、易自力等^[7]、张平等^[8]分别对愈伤组织诱导、状态保持、抗性愈伤筛选、分化及植株再生等进行了较为详实的研究, 取得了一些有益的结果。本研究着重探讨菌株互作及菌状态、干燥培养、分化和移栽等因素对农杆菌转化水稻的影响, 以期能与前人的研究结果互为补充, 建立一个转化率高、稳定性好、通用性强的水稻农杆菌转化体系, 并利用此体系获得有价值的转基因植株。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

籼稻为蜀恢 527、CDR22、501R; 粳稻为中花 9 号、日本晴。

1.2 质粒和菌株

pCUBAC-HPT 由中国科学院遗传与发育生物学研究所遗传操作实验室构建, 含 *sbk* 和 *sck* 双价抗虫基因, 赋予转基因水稻抗鳞翅目害虫的能力。筛选标记基因为 *hpt*, 编码潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase)。质粒结构见图 1。

农杆菌菌株为 AGL1 和 EHA105, 由四川农业大学水稻研究所实验室保存。

1.3 培养基

农杆菌培养基: YEP+50 mg/L Kanamycin(sul-fat(km))+50 mg/L Rifampicin(Rif); 诱导、继代培养基 NB₂: NB^[9]+2 mg/L 2,4-D; 共培养基 NBco: NB+2 mg/L 2,4-D+100 μmol/L Acetosyringone(AS); 预培养基 NBpre: NB+2 mg/L 2,4-D+300 mg/L Cefotaxime(Cef); 筛选培养基 NBs: NB+2 mg/L 2,4-D+30~70 mg/L Hygromycin(Hyg)+300 mg/L Cefotaxime(Cef); 分化培养基:

收稿日期: 2004-07-23; 修改稿收到日期: 2004-10-07。

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2003AA212030)。

第一作者简介: 李双成(1979—), 男, 在读博士研究生。

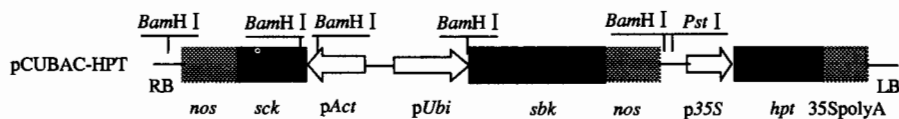


图1 质粒 pCUBAC-HPT 结构图

Fig. 1. Construction of plasmid pCUBAC-HPT.

MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA; 壮苗培养基: (1/2)MS+0.4 mg/L NAA; 以上水稻培养基各加入琼脂粉至 6 g/L。

1.4 水稻愈伤组织培养

取开花后 14~18 d 的水稻未成熟种子, 去壳, 用 75% 酒精消毒 2 min, 再用 0.1% 的升汞消毒 18 min, 用无菌水洗涤 4~5 次, 接种到诱导培养基上。27℃±1℃ 下暗培养 8~10 d 诱导愈伤组织, 待胚芽长到 1 cm, 严格挑选质量好的无菌胚性盾片愈伤组织继代数次。

1.5 农杆菌介导转化水稻

1.5.1 农杆菌的培养

从根癌土壤杆菌平板(4℃下保存)上挑取单菌落于 YEP 液体培养基(Km 和 Rif 各 50 mg/L)中, 28℃ 下振荡培养 12~18 h, 然后取 1~5 mL 菌液接种到 100 mL YEP 液体培养基(含 AS 100 μmol/L)中, 振荡培养 4 h 后直接或经短暂离心后用 YEP、NB、YEP/NB(体积比为 1:1)稀释至相应浓度(OD₂₆₀=0.5), 即肉眼见稍浑浊即可, 以备转化之用。

1.5.2 共培养

取生长旺盛的胚性愈伤组织置于灭菌培养皿中, 加入相应浓度的农杆菌液浸泡 25 min 后, 吹干表面菌液, 将愈伤组织转接于共培养基上, 28℃ 下暗培养 2~3 d。

1.5.3 预培养

将共培养愈伤组织转移到无菌三角瓶中, 经洗菌后作 4 种处理: 1) 直接转接于预培养基上; 2) 超净工作台上吹 4 h 左右(风速约 0.4 m/s), 再转接于预培养基上; 3) 转接于带有 3 层滤纸的预培养基上; 4) 转接于琼脂粉加倍的预培养基上。28℃ 下暗培养 3~7 d。

1.5.4 愈伤组织筛选培养

将预培养的愈伤组织转接于含 Hyg 和 Cef 的筛选培养基上继续培养 3~4 周, 再将抗性愈伤组织

转接于仅含 Hyg 的筛选培养基上, 筛选 1~2 次。

1.5.5 抗性愈伤组织分化、再生及移栽

取抗性愈伤组织转接于分别添加脯氨酸(Pro)、二甲基亚砜(DMSO)、AgNO₃、肌醇和不附加任何物质的分化培养基上, 28℃ 下光照培养, 待其现绿。当绿点长成小苗时, 将小苗转接于不同浓度的 NAA 生根培养基上, 28℃ 下光照培养 3~4 周, 开放培养炼苗 7 d 左右, 最后移栽到大田。

调查统计方法: 抗性愈伤率=抗性愈伤数/供试愈伤数×100%; 分化率=再生植株数/抗性愈伤数×100%; 转化率=阳性苗数/供试愈伤数×100%。每个处理 2~3 个重复, 单因素随机设计, 采用 DPS 软件进行统计分析。

1.6 抗性植株的分子检测

PCR 检测: 取 10~30 mg 水稻幼嫩叶片置于 1.5 mL 离心管中, 加 200 μL 0.5 mol/L NaOH, 用玻璃棒研细后, 10 000 r/min 下离心 10 min。取 40 μL 上清液, 加入 160 μL 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 混匀, 10 000 r/min 下离心 5 min, 上清液即可作 PCR 反应的模板。hpt 正向引物: 5' TAC ACA GCC ATC GGT CCA GA 3', 反向引物: 5' TAG GAG GGC GTG GAT ATG TC 3', 扩增的片段为 832 bp。PCR 采用 20 μL 反应体系: 2 μL 10×缓冲液、两个引物各 1 μL (终浓度为 1 pmol/L)、2 μL 模板、2 μL dNTP (终浓度 200 μmol/L)、0.2 μL Taq 酶(1 U), 用无菌的双蒸水补足体积, 最后在反应体系上覆盖一层液体石蜡油。PCR 反应条件如下: 94℃ 下预变性 5 min, 94℃ 下变性 1 min, 55℃ 下退火 1 min, 72℃ 下延伸 1 min, 35 个循环结束后, 72℃ 下继续延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖、120 V 电泳检测。

点杂交: DNA 制备和杂交参照 Sambrook 等的方法^[10]; 质粒 Hpt 引物扩增条带作为探针, 探针标记及显影按 Amersham Bioscience 公司的 ECL 试剂盒说明书进行。

表 1 两种菌株混合转化及其配比对抗性愈伤率的影响
Table 1. Co-transformation and its influence on the resistant calli rate.

菌株及配比 Strain & ratio	供试愈伤数		抗性愈伤数		抗性愈伤率	
	No. of tested calli		No. of resistant calli		Resistant calli rate/%	
	日本晴 Nipponbare	CDR22	日本晴 Nipponbare	CDR22	日本晴 Nipponbare	CDR22
EHA105(E)	187	167	83	60	44.5 C	35.9 C
AGL1(A)	201	194	81	55	40.3 C	28.4 D
E/A(1:1)	194	190	100	78	51.6 B	41.2 AB
E/A(1:2)	252	243	128	95	50.8 B	39.1 BC
E/A(2:1)	312	297	182	131	58.2 A	44.0 A
F 值 F value	—	—	—	—	50.44	56.86

抗性愈伤率为 2 次重复的平均值；同栏中，大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著(Duncan 法)。下表同。
Resistant calli rate is the mean value of two repeats; Within a column, uppercase and lowercase letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels by the Duncan's method, respectively. The same as in the tables below.

2 结果与分析

2.1 两种菌株的共转化

试验分别挑取保存在平板上的 AGL1 和 EHA105 单菌落，经相同时间的复壮和扩大培养后，分别按表 1 处理用于转化。结果显示，EHA105 的转化效果优于 AGL1，而两种菌液混合共转化的抗性愈伤率均比单独转化时要高；EHA105 和 AGL1 菌液按体积比 2:1 混合用于转化的效果较其他处理好(图 2-A1)，其抗性愈伤率达到 58.2%(日本晴)和 44.0%(CDR22)，与其他处理的差异达极显著水平。表明 EHA105 和 AGL1 两种菌株的确有协同作用，但在共转化时要获得最大的协同效应要求有一定的体积配比。

2.2 不同培养基重悬菌体的转化效果

利用 EHA105 菌株进行了重悬实验。当 EHA105 单菌落经复壮和扩大培养后，采用表 2 的 4 种处理用于对蜀恢 527 的转化。从表 2 可以看出，几种不同的重悬处理的抗性愈伤率要明显地高于直接转化，原因可能在于重悬有利于消除扩大培养过程中代谢产物和抗生素的筛选压对菌株活性的影响；同时，用 NB 培养基重悬的效果比用 YEP 好(图 2-A3)；而 YEP 与 NB 按 1:1 的体积比混合重悬的效果与单独用 NB 重悬的差异不明显。这说明在转化过程中适宜用 NB 重悬菌体后侵染愈伤组织，其原因可能是 NB 有利于维持愈伤组织的状态而对农杆菌的状态没有明显不利的影响；相反，YEP 虽有利于菌体维持良好的状态，但在侵染过程中会对愈伤组织产生不利影响。

2.3 干燥培养对抗性率和分化率的影响

很多研究者对不同的干燥培养方式进行了研

表 2 不同培养基重悬 EHA105 菌体对蜀恢 527 抗性愈伤率的影响

Table 2. Influence of re-suspending the EHA105 strain on the resistant calli rate of Shuhui 527.

方法 Method	供试愈伤数	抗性愈伤数	抗性愈伤率
	No. of tested calli	No. of resistant calli	Resistant calli rate / %
直接转化 CK	143	42	29.2 B
YEP	162	53	32.7 AB
NB	152	57	37.3 A
YEP/NB(1:1)	155	57	36.8 A
F 值 F value	—	—	12.65

究，大多认为干燥培养方式对分化率有明显影响。我们对前人研究的几种干燥培养方式在同一条件下进行了研究，以期作出较为客观的评价。表 3 的结果显示(因分化数据调查群体较小，未进行统计分析)，与不进行干燥培养相比，各种干燥培养方式在两种受体材料的抗性愈伤率和分化率上均有不同程度的提高(但多数未达显著水平)。就 3 种干燥方式而言，琼脂粉加倍的干燥方式在中花 9 号上获得了最佳效果，抗性愈伤率和分化率都居各处理之首；而在超净工作台上吹干 4 h 的方式则更有利于 CDR22 的转化和再生(图 2-D)，抗性率和分化率明显高于其他处理。提示干燥培养能够有效地提高抗性率和分化率，但不同的受体材料其最适宜的干燥方式不尽相同，这可能与受体的基因型和干燥处理时愈伤的状态有关。

2.4 添加物对分化率的影响

脯氨酸(Pro)是一种有效的细胞渗透调节物质，干燥处理愈伤可以提高再生频率的原因可能就在于 Pro 的积累[6]；AgNO₃ 广泛地应用于花药培养，用来降低褐化和促进分化[11]；DMSO 是一种典型的细胞保护剂，可提高逆境下细胞的存活率[6]；而谷

表 3 不同干燥培养方式对抗性愈伤率和分化率的影响

Table 3. Influence of different methods on resistant calli rate and differentiation rate for desiccation culture.

方法 Method	脱菌愈伤数 No. of uncontaminated calli		抗性愈伤数 No. of resistant calli		再生植株数 No. of regenerated plantlets		抗性愈伤率 Resistant calli rate/%		分化率 Differentiation rate/%	
	中花 9 号 Zhonghua 9		中花 9 号 Zhonghua 9		中花 9 号 Zhonghua 9		中花 9 号 Zhonghua 9		中花 9 号 Zhonghua 9	
	CDR22		CDR22		CDR22		CDR22		CDR22	
不干燥处理 CK	144	97	65	33	19	5	45.2 B	34.2 B	29.2	15.2
滤纸干燥 FP	161	103	74	37	22	7	46.0 AB	35.8 AB	29.7	18.9
琼脂粉加倍 DAP	152	86	79	32	27	6	52.1 A	37.3 AB	34.2	18.8
风干 4 h FHF	147	92	69	38	22	8	47.1 AB	41.5 A	31.9	21.1
F 值 F value	—	—	—	—	—	—	10.51	9.16	—	—

CK, Without desiccation treatment; FP, Desiccation with filter paper; DAP, Desiccation by doubling the agar powder; FHF, Desiccation with 4-hour air flowing.

表 4 添加物及其浓度对分化率的影响

Table 4. Influence of additive and its concentration on the differentiation rate.

处理 Treatment	蜀恢 527 Shuhui 527	CDR22	501R	日本晴 Nipponbare
CK	13.5 b	15.1 bc	12.3 d	35.1 abc
脯氨酸 Pro				
100 mg/L	15.2 ab	17.9 ab	16.4 ab	37.6 a
300 mg/L	14.7 ab	14.6 bc	16.9 a	32.3 c
500 mg/L	14.0 b	15.0 bc	15.9 abc	34.2 abc
AgNO ₃				
4 mg/L	12.7 b	15.0 bc	13.2 cd	35.2 abc
6 mg/L	13.4 b	14.2 c	14.0 abcd	37.1 a
8 mg/L	13.9 b	13.9 c	11.9 cd	34.8 abc
二甲基亚砜 DMSO				
0.02%	15.2 ab	17.8 ab	13.0 d	34.6 abc
0.04%	17.3 a	19.6 a	16.7 ab	36.3 ab
0.06%	15.4 ab	15.9 bc	16.7 ab	33.1 bc
谷氨酰胺 Gln				
300 mg/L	14.2 b	16.2 bc	11.9 d	34.4 abc
500 mg/L	14.6 ab	15.7 bc	13.6 bcd	36.9 a
700 mg/L	13.0 b	15.0 bc	12.4 d	36.2 ab
F 值 F value	1.970	2.770	4.443	2.080

注:分化率为 2 次重复的平均值。

Note: Differentiation rate is the mean value of two repeats.

氨酰胺(Gln)是一种较优良的 N 源供体,在一定的浓度条件下可以促使愈伤组织旺盛生长,同时又不易丧失胚性^[12]。笔者曾在继代培养基中添加 Pro、AgNO₃、DMSO、Gln,降低了愈伤组织褐化率,取得了明显的效果(资料未发表),本试验尝试在分化培养基中添加上述物质,以期提高分化率。

从表 4 的结果可以看出,添加 Pro、DMSO 都能较明显地提高植株再生频率(图 2-B、C),Gln 和 AgNO₃的作用则不明显。就提高分化率的平均效果而言,以 DMSO 较好,4 个参试材料的最佳浓度都是 0.04%;而 Pro 的较适宜浓度除受体 501R 外,其余均在 100 mg/L 的浓度下取得了较好的效果。

这与叶松青等^[6]的降低褐化率的研究结果基本一致。表中数据还显示这两种处理在籼稻上效果明显,特别对分化效果差的 501R 的作用显著,但对日本晴却没有明显的影响。说明这些处理对那些难以转化的水稻材料的转化可能会有一定的帮助。

2.5 NAA 对壮根的影响

移栽存活率低也是限制转基因应用的一大障碍,其最根本的原因在于试管苗的根系不发达。本试验尝试在生根培养基中添加 NAA 以促进根系的生长。结果表明,生根培养基中添加 0.4 mg/L 的 NAA 能有效改善新根的质量,尽管新根的长度较对照明显下降,但其数量增多,色泽更白,根系发达,

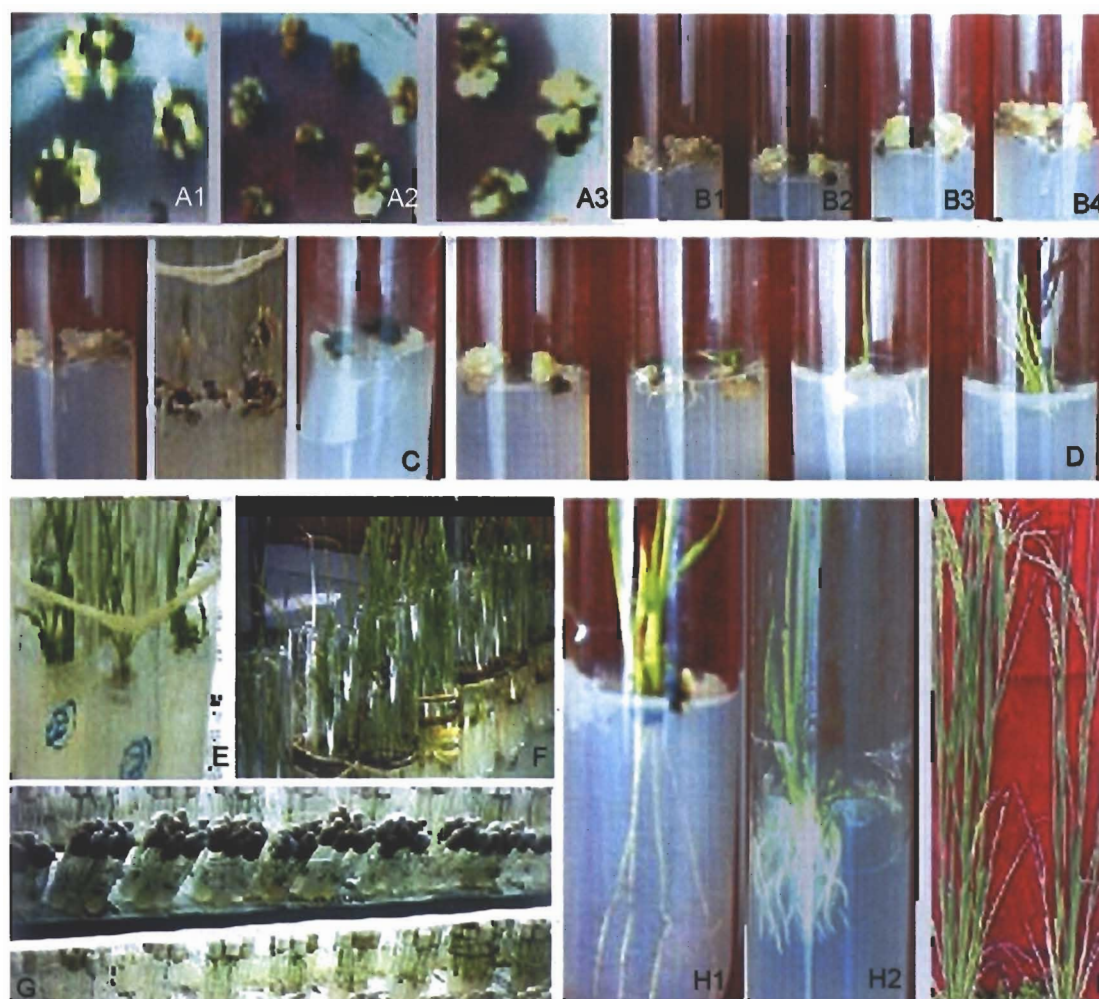


图2 转化过程中部分处理的效果

Fig. 2. Effect of some treatments during the transformation.

A—抗性愈伤的获得。A1—EHA105/AGL1 按体积比 2:1 共转化；A2—对照(未经重悬的 EHA105)；A3—EHA105(经 NB 重悬)。B—添加物对分化的影响。B1— AgNO_3 ；B2—脯氨酸；B3—DMSO；B4—谷氨酰胺。C—不添加附加物的 527R 在分化中易褐变死亡。D—CDR22 经风干 4 h 后顺利分化。E—生根培养基中添加 NAA 的壮苗情况。F—室内开放培养。G—大量转化植株的获得。H—NAA 对生根的影响。H1—对照(不添加)；H2—添加 0.4 mg/L 的 NAA。I—可育转基因植株的获得。

A, Generation of resistant calli. A1, Co-transformation of EHA105 and AGL1 with the ratio of 2:1 in volume; A2, Control(EHA105 without re-suspending); A3, EHA105 re-suspended with NB. B, Influence of additive on differentiation. B1, AgNO_3 ; B2, Proline; B3, DMSO; B4, Gln. C, Calli from 527R browned and died without any additive during differentiation; D, Calli from CDR22 succeeded in differentiation after desiccation with 4-hour blowing. E, Strong seedling gained by adding NAA to the rooting culture media. F, Opening culture of the seedling in room. G, A lot of transformed plants gained by the developmental protocol. H, Influence of NAA on rooting. H1, Control(no additives); H2, 0.4 mg/L NAA. I, Fertile transgenic plants obtained.

植株健壮，叶色深绿，田间成活率经多个材料试验均达到或接近 100%；但对照新根细弱，颜色发黄，毛根甚少且发黑，植株纤细瘦弱，移栽时易折断，仅能存活 80% 左右(图 2-E, H)。

2.6 转基因阳性植株的获得

应用本研究的转基因体系，即把提高抗性愈伤率和分化率的几个处理累加(EHA105 和 AGL1 2:1 混合共转化、NB 重悬、风干 4 h 干燥、分化培养

基中添加 0.04% 的 DMSO 以及生根培养基中添加 0.4 mg/L 的 NAA 等)分别得到了供试材料的大量阳性转基因植株(图 2-F, G, I)。其中梗稻的平均转化率达到 21.4%，而籼稻的平均转化率达到 9.3%，比常规(本试验对照，即不进行上述任何处理)转化率(梗稻 13.1%；籼稻 3%)有了明显的提高，差异均达极显著水平(表 5，蜀恢 527 和 501R 因对照数据较少未进行显著性分析)。不仅显示出这些处理提

表 5 转基因植株的获得及数量
Table 5. Number and frequency of transgenic plants.

受体 Receptor	供试愈伤数		阳性苗数		转化率		F 值 F Value
	No. of tested calli		Positive seedling		Transformation rate/%		
	对照	处理	对照	处理	对照	处理	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment	
日本晴 Nipponbare	214	723	31	175	14.6	24.2	43.20**
中花 9 号 Zhonghua 9	253	775	29	144	11.5	18.5	29.02**
CDR22	252	794	12	91	4.6	11.4	32.79**
蜀恢 527 Shuhui 527	212	580	6	42	2.8	7.2	—
501R	190	755	3	71	1.6	9.4	—

注:转化率是 3 个重复的平均值; ** 在 0.01 水平上差异显著。
Note: Transformation rate is the mean value of three repeats; ** Significant at 0.01 level.

高转化率的有效性,同时也证明了此体系的多个处理在效应上具有一定的累加和互作。来自独立克隆的转基因植株的 PCR 检测表明,大多数抗性植株含有 T-DNA 插入(图 3-A);对 PCR 检测为阳性的植株进一步进行 Dot-blotting 鉴定,所有 PCR 阳性植株都含有目的片段(图 3-B),证实了本方法的可靠性。

3 讨论

农杆菌转化法是一个细菌和愈伤组织共同作用的复杂过程。凡是涉及到细菌活性或愈伤组织状态的因素都可能影响转化效果。对水稻而言,一方面是愈伤组织诱导、再生的频率不高,另一方面可能是它对农杆菌的侵染并不比双子叶植物敏感。因此农杆菌对水稻的转化往往难以获得理想的效果。前人的研究主要集中在高频受体系统的建立、促进分化再生因素等方面^[5~8]。本研究试图从转化前农杆

菌活性、愈伤组织状态、菌株协同性等转化过程本身因素以及干燥处理和添加物质促进分化等方面来探讨其对转化率的影响,取得了较为理想的效果。试验表明,EHA105 和 AGL1 的混合共转化、NB 培养基重悬菌株可以明显提高抗性愈伤率;琼脂粉加倍、超净工作台上风干 4 h 的干燥方式和分化培养基中添加二甲基亚砜和脯氨酸可以在一定程度上提高再生频率;同时,对生根的研究发现,添加 0.04% 的 NAA 有利于生根和提高移栽存活率。应用此系统,获得了大量的转基因植株,转化率较常规转化方法有了显著的提高,说明上述措施在提高转化率上具有累加作用。不仅如此,转化率的提高幅度明显超过了各种改良措施贡献率的累加,说明这些措施之间可能存在很大互作。因此,对这些措施提高转化率内在原因特别是相互间作用尚需进一步深入研究。同时,这些结果也说明农杆菌转化水稻的影响因素纷繁复杂,要建立一个转化率高、稳定性好、通

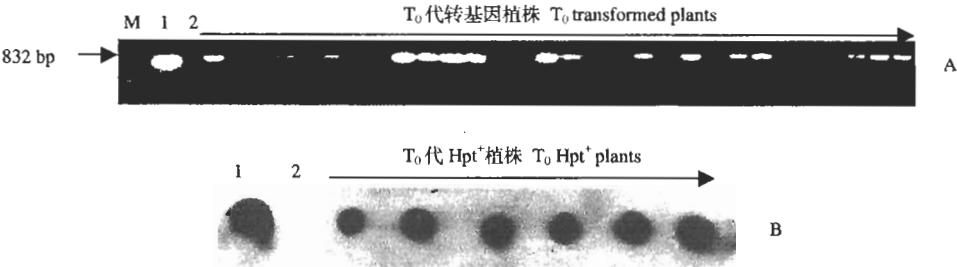


图 3 T₀代转化再生植株分子检测
Fig. 3. Hpt PCR analysis of T₀ transformed plants.
A—Hpt PCR 分析; B—Dot-blotting 分析; M—DNA marker; 1—阳性对照; 2—阴性对照。
A, Hpt PCR analysis; B, Dot-blotting analysis; M, DNA marker; Lane 1, Positive control; Lane 2, Negative control.

用性强的水稻农杆菌转化体系需要深入系统的研究,但也可以认为,水稻的农杆菌转化体系还有很大的提升空间。

本试验的转化效率得到了较大程度的提高,但阳性率明显偏低(图3),主要是由于本试验仅在筛选阶段添加了30~70 mg/L的潮霉素而在分化和生根阶段都去掉了潮霉素筛选压的缘故。试验中发现,分化时添加潮霉素显著抑制分化,以蜀恢527和501R最为敏感,即便在远低于筛选时的潮霉素浓度压力下也很难得到分化小苗。为确保得到转基因的阳性苗,本试验尝试在筛选时加大筛选压,而在分化和生根过程中去掉筛选压,分化率得到了极大的提高。获得的小苗的分子检测表明,多数植株含有目的基因。相比之下,本方法特别适用于那些在分化阶段对潮霉素极为敏感的受体材料的转化。这与易自力等^[7]和张平等^[8]的V型筛选法基本吻合。不同点在于,我们认为在生根阶段没有必要再加入筛选压,原因有三:一方面,试验中发现经常有含目的基因的小苗其潮霉素抗性较差,而生长势较强的假阳性植株则可以抵抗一定的筛选压,这对于本来不易得到小苗的受体材料的转化不利;另一方面,应用本试验的简易DNA提取方法可以方便快捷地对转化小苗作出分子鉴定,虽一定程度上增加了后期检测的工作量,但与持续添加潮霉素相比较,其成本并未见明显增加;此外,大量小苗的生根壮苗步骤在试管中进行效果理想,但在试管中添加潮霉素却比在培养皿中更为烦琐。虽然本试验的阳性率较大多数的转基因研究的结果低,但我们得到了大量的转基因阳性植株,而这是得到高效表达目的基因的转基因材料的前提。有鉴于此,我们采用的方法对获得理想的转基因植株来说应该具有积极的意义。

谢辞:马炳田副教授、张红宇博士在试验过程中给予很多中肯建议,谨致谢忱!

参考文献:

- 1 Chan M T, Chang H H, Ho S L, *et al.* *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plants expression a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 491-506.
- 2 Hiei Y, Ohta S, Kumashiro T, *et al.* Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271-282.
- 3 Rashid H, Yokoi S, Hinata K, *et al.* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 727-730.
- 4 翟文学,李晓兵,田文忠,等. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 *Xa-21* 转入我国的5个水稻品种. *中国科学(C辑)*, 2000, 30(2): 200-206.
- 5 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. *植物生理学报*, 1998, 24(3): 259-271.
- 6 叶松青,储成才,曹守云,等. 提高水稻转化效率几个主要因素的研究. *遗传学报*, 2001, 28(10): 933-938.
- 7 易自力,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.
- 8 张平,左示敏,李爱宏,等. 提高农杆菌转化水稻频率几个因素的研究. *中国水稻科学*, 2004, 18(1): 11-15.
- 9 Li L C, Qu R D, de Kochko A, *et al.* An improved rice transformation system using biolistic method. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 250-255.
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manul*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474-490.
- 11 George L, Rao P S. In vitro induction of pollen embryos and plantlets in *Brassica sunsea* through anther culture. *Plant Sci Lett*, 1982, 26(1): 111-116.
- 12 王海波,魏景芳,葛亚新,等. 小麦愈伤组织状态调控与原生质体培养. *中国农业科学*, 1996, 29(6): 8-14.