DOI:10.3724/SP.J.1238.2013.00471

农杆菌介导的遗传转化籼稻 Kasalath 的条件优化

周艳，黄亚萍，周遥，吴亚先，周兰英，姜孝成*

(湖南师范大学生命科学学院，湖南 长沙 410081)

摘　要：Kasalath 是目前用于水稻转基因研究的籼稻模式材料。运用组织培养和农杆菌介导的遗传转化技术，对水稻 Kasalath 愈伤组织诱导和遗传转化体系进行了优化。结果表明：以 Kasalash 的幼嫩种子或新鲜的成熟种子为外植体诱导愈伤组织的效果优于贮藏 1 年的种子；用 0.5、1、1.5、2、2.5、3、10、20、30 mg/L 的 2,4–D 诱导愈伤组织，以 2.5 mg/L 的 2,4–D 诱导效果最佳；用菌液 $OD_{600\ nm}$ 为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4 的农杆菌 Ag10 和 EHA105 与愈伤组织共培养介导遗传转化，皆以 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15 的农杆菌溶液效果最好，且 EHA105 的介导效果比 Ag10 更佳，其抗性愈伤率可达 82.0%；EHA105 的介导(共培养)时间以 3 d 为宜；分化培养前对愈伤组织进行 6～8 h 快速干燥或 48～72 h 慢速干燥处理，可以明显提高愈伤组织的再生成苗率，并缩短分化时间；在对愈伤组织侵染处理前的预培养处理和对抗性愈伤进行分化培养前的预分化培养处理对 Kasalath 的遗传转化效率影响不大，可省略以缩短遗传转化时间。遵循以上优化条件，从愈伤组织诱导至遗传转化获得再生植株全过程的时间只需 57～60 d(已报道的遗传转化全过程需 70 d 以上)，遗传转化效率可达到已报道的最高值 65%。

关　键　词：籼稻；2,4–D；农杆菌介导；遗传转化；影响因素

中图分类号：S511.2^{+}10.353　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1007–1032(2013)05–0471–07

Study on the method for effecient and rapid genetic transformation of Kasalath mediated by *Agrobacterium*

ZHOU Yan, HUANG Ya-ping, ZHOU Yao, WU Ya-xian, ZHOU Lan-ying, JIANG Xiao-cheng*

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: At present, Kasalath is a model *Indica* material for rice transgenic research. By using the technique of plant tissue culture and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, we optimized the condition for the callus induction and the performance of genetic transformation of Kasalath. The results showed that immature or newly harvested mature seeds as explants were more effective to generate callus than the seeds stored for 1 year. Among the induction media with 0.5，1，1.5，2，2.5，3，10，20 or 30 mg/L 2,4–D solutions, the medium with 2.5 mg/L 2,4–D had the best performance in callus induction; in callus infection by co-culturing with *Agrobacterium* Ag10 or EHA105 solution with $OD_{600\ nm}$ being 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3 or 0.4, the efficiency of transformation reached the optimum when $OD_{600\ nm}$ of the working solution of both Ag10 and EHA105 was 0.15, but EHA105 was superior to Ag10, its hygromycin-resistant callus reached up to 82.0% and 3 d co-culture with EHA105 was perfect. When the resistant calli suffered rapid dehydration for 6–8 h or slow dehydration for 2–3 d, the regeneration frequency was evidently improved and the time needed for regeneration was shortened; while pre-culture before callus infection and pre-differentiation processing before hygromycin-resistant callus getting onto differentiation culturing had little effect on genetic transformation efficiency, so these procedures could be omitted. By the optimized procedures, the overall time from callus induction to regeneration of transformant plantlets was shortened to 57–60 d, and 65% of transformation efficiency was attained.

收稿日期：2013–04–19
基金项目：国家自然科学基金项目(31071487；31270348)；湖南省生态学重点学科建设项目(0713)
作者简介：周艳(1987—)，女，湖南益阳人，硕士研究生，主要从事种子生物学研究，315658395@qq.com；*通信作者，jxclc@hunnu.edu.cn

Key words: *Indica* rice; 2,4–D(2,4–dichlorophenoxyacetic acid); *Agrobacterium*–mediated; genetic transformation; influence factors

水稻(*Oryza sativa* L.)是最重要的粮食作物之一，全世界近40%的人口以稻米为主食。随着世界人口的不断增长和人们生活水平的提高，如何提高水稻的产量和质量，一直是水稻育种工作者高度关注的问题。籼稻和粳稻是在地理分布上受地势或纬度高低影响而演变成的两大气候生态类型[1]。一般认为，粳稻是籼稻分化演变的变异型。在组织培养时，粳稻愈伤组织的诱导或再生能力都优于籼稻[2]。但籼稻是广泛栽培的水稻亚种，提高籼稻组织培养中植株的再生频率一直是转基因技术中面临的主要问题。籼稻Kasalath是用于水稻转基因研究的模式材料，有较高的遗传转化效率，但研究者们得到的结果不尽一致[2–4]。本研究旨在对影响Kasalath愈伤组织诱导、遗传转化效率和植株再生的条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材 料

植物材料：籼稻 Kasalath，由湖南师范大学植物发育与分子实验室提供。

菌株和载体：大肠杆菌 *E.coli* TOP10，由湖南师范大学植物发育与分子实验室保存；农杆菌EHA105、Agl0 及载体 GCS–2*FLAG+en35s–AsRed–pCambia1301–UbiN(以下简称 *GCS*)均由北京生命科学研究所邓兴旺实验室提供。其中 *GCS* 载体自带有 *HPT* 标记基因，并在本研究室重新构建，人工插入了水稻 *IPS1* 基因。

主要试剂：2,4–二氯苯氧乙酸(2,4–D)、脱落酸(ABA)、N6–呋喃甲基腺嘌呤(激动素, KT) 、萘乙酸(NAA)、250 mg/mL 头孢霉素(Cef)、羧苄青霉素(Cb)，乙酰丁香酮(As)，均购自生工生物工程(上海)股份有限公司；潮霉素B购自罗氏公司；AL2000 DNA Marker购自北京艾德莱生物科技有限公司。N6、MS母液根据文献[5]配制。

各不同用途的培养基成分见表1。

表 1 不同用途的培养基组成成分

Table 1 Components of culture medium for various purposes

培养基	山梨醇/ ($g·L^{-1}$)	脯氨酸/ ($g·L^{-1}$)	水解酪蛋白/ ($g·L^{-1}$)	2,4–D/ ($mg·L^{-1}$)	ABA/ ($mg·L^{-1}$)	NAA/ ($mg·L^{-1}$)	KT/ ($mg·L^{-1}$)	琼脂/ ($g·L^{-1}$)	AS/ ($mg·L^{-1}$)	Cef/ ($mg·L^{-1}$)	Cb/ ($mg·L^{-1}$)	潮霉素 B/ ($mg·L^{-1}$)
诱导	0	2.8	0.3	0.50~30.0	0	0	0	3.5	0			
预培养	0	0.5	0.3	2	0	0	0	7	20			
共培养	0	0.5	0.3	2	0	0	0	7.2	20			
筛选	0	0.5	0.3	2	0	0	0	3.4	0	300	500	50
预分化	0	0.5	0.3	0	5	0		4	0	250	500	50
分化	30	0	2	0	0	0.02	0.02	4		250		50
生根	0	0	0	0	0	0.05	0	3.4	0			

诱导、预培养、共培养、筛选、预分化培养基所用母液为 N6；分化、生根培养基所用母液为 MS；诱导、筛选、预分化、分化、生根培养基均添加蔗糖(30 g/L)；预培养、共培养用培养基均添加葡萄糖(10 g/L)；诱导、预分化、分化、生根培养基 pH 均调至 5.8；预培养、筛选培养基 pH 均调至 5.6；共培养用培养基 pH 调至 5.2。

1.2 方 法

1.2.1 Kasalath 种子的胚性愈伤组织诱导

采集授粉后 15 d 的种子(细嫩种子，处理 A)、成熟干燥的新鲜健壮种子(处理 B)和自然贮藏 1 年的健壮种子(处理 C)为外植体进行愈伤组织诱导：剥除颖壳，消毒[5]，阴干 30 min 后，每个处理以 60 粒/皿接种于诱导培养基上。每个处理 5 个重复。28 ℃暗培养。配备 2, 4–D 质量浓度分别为 0.5、1、1.5、2、2.5、3、10、20、30 mg/L 的诱导培养基，选用成熟干燥的新鲜健壮种子为外植体，以上述方法进行愈伤组织的诱导。

1.2.2　预培养处理

为探讨预培养对转化效率的影响，挑选 1.2.1 中处理 B 组的良好胚性愈伤块于预培养基上，3 个重复，28℃暗培养 3 d，然后进行农杆菌的侵染处理和分化处理，统计抗性愈伤率。与不经过预培养而直接进行侵染和分化处理的材料进行比较。

1.2.3　不同浓度的工程菌(EHA105 或 Ag10)侵染愈伤组织

挑选1.2.1中处理B组的良好胚性愈伤块及1.2.2中经预处理的愈伤块于三角瓶中，分别加入 150 mL 不同浓度(菌液 $OD_{600\ nm}$=0.05、0.15、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4)的农杆菌(EHA105 或 Agl0)菌液，28 ℃条件下，摇床上 150 r/min 侵染 20 min 后，阴干 30～40 min；于共培养基上放 1 张滤纸，把侵染后阴干的愈伤块置于其上，100 块/皿，3 个重复。密封培养皿，28 ℃黑暗条件下让愈伤组织和农杆菌共培养 3 d。

选用菌液 $OD_{600\ nm}$=0.15 的 EHA105 侵染胚性愈伤块，按上述方法操作，共培养时间分别为 1、2、3、4、5 d，探究共培养时间对遗传转化的影响。

1.2.4　抗性愈伤的筛选

共培养后的愈伤用含 400 mg/L Cef 的无菌水洗涤 2~3 次，再加入含 400 mg/L Cef 的 N_6 液体筛选培养基，于摇床上 100 r/min 轻摇 10 min，振荡洗涤 1 次，然后将愈伤块转移至无菌条件下阴干 30 min，再接种于筛选培养基上，28 ℃下暗培养 20 d 左右；将抗性愈伤块转移至新的筛选培养基上，继续暗培养 5 d，统计抗性愈伤率和农杆菌抑制率。

抗性愈伤率=筛选阶段长出的新生愈伤块数/接种愈伤块数×100%。

农杆菌抑制率=筛选阶段未长菌的愈伤块数/接种愈伤块数×100%。

1.2.5　愈伤组织的干燥脱水处理和分化培养

将上述筛选获得的抗性愈伤块置于培养皿中 3 层无菌滤纸上，再覆盖 2 层滤纸，分为 2 组：一组进行快速干燥，即在超净台上 28 ℃下分别吹风处理 0、2、4、6、8 h；另一组慢速阴干，即盖上培养皿盖，封上封口膜，在 28 ℃条件下分别放置 0、1、2、3、4 d。然后将愈伤块分别接种到分化培养基上，28 ℃、16 h 光照(5 000 lx)培养，直至长出再生苗，统计植株再生频率。

植株再生频率 = 分化产生再生苗的愈伤块数/接种的抗性愈伤块数×100%。

为探讨预分化处理对植株再生频率的影响，将抗性愈伤块接种于预分化培养基上，28 ℃、16 h 光照(5 000 lx)培养 7 d，进行预分化处理；然后按前述的方法快速干燥 6 h，再接种到分化培养基上，28 ℃、16 h 光照(5 000 lx)培养，直至长出再生苗，统计植株再生频率。与未进行预分化处理而直接进行快速干燥 6 h 和分化处理的材料进行比较。

1.2.6　幼苗生根处理

将分化培养获得的生长优势明显的再生苗(T_0 代植株)转移到生根培养基上，在 28 ℃、16 h 光照(5 000 lx)下培养。

1.2.7　转基因植株的 PCR 检测

提取再生植株(T_0 代)叶片的 DNA，采用表达载体与目的基因的嵌合体片段 *GCS–IPS1* 的引物进行鉴定，正向引物 *GCS*–F，5′–gtaacatagatgacaccgcgcgcg–3′；反向引物 *IPS1*–R，5′–ggcacacacaatcttaattactaatatcaaattcatc –3′，理论扩增长度为 880 bp。同时用潮霉素 B 磷酸转移酶(hygromycin B phosphotransferase, HPT)基因引物进行鉴定，正向引物 *HPT*–F，5′–gctgttatgcggccattgtc–3′；反向引物 *HPT*–R，5′–ccgcgacgtctgtcgagaag –3′，理论扩增长度为 590 bp。

阳性突变体植株获得率=阳性突变体植株数/检测的 T_0 代转基因植株数×100%。

遗传转化效率=抗性愈伤率×植株再生频率×阳性突变体植株获得率。

1.2.8　数据统计分析

数据处理采用 Excel 和《临床医生统计学助手 V3.0》进行。

2　结果与分析

2.1　不同生理活性种子的胚性愈伤组织诱导效率的差异

外植体的生理活性可能影响愈伤组织的诱导。表2的结果表明，幼嫩种子(处理A)和成熟的新鲜种子(处理B)的愈伤诱导率明显比自然贮藏1年的种子(处理C)的高。

表 2 不同生理活性种子的胚性愈伤组织诱导效率

Table 2 Callus induction from seed embryo with different physiological activity

处理	接种数/粒	诱导出愈伤组织的种子数/粒	愈伤组织诱导率/%
A	60	53±2	(88.0±3.2) A
B	60	48±2	(80.3±2.6) B
C	60	40±2	(67.0±3.3) C

表中数据为 5 个重复的平均值；数字后不同小写字母表示差异显著；不同大写字母表示差异极显著，下同。

2.2 2,4–D 的质量浓度对愈伤组织诱导效率的影响

从表 3 可以看出，随着诱导培养基中 2,4–D 的质量浓度增加，种子的愈伤诱导率逐渐提高，当质量浓度为 2.5 mg/L 时，愈伤诱导率达最高值，愈伤组织质量最佳；当 2,4–D 质量浓度继续升高时，愈伤诱导率虽然仍处于较高水平，但愈伤组织体积比较小，生长缓慢，几乎失去增殖能力，不利于后续分化或侵染处理。

表 3 2,4–D 的质量浓度对 Kasalath 种子的愈伤组织诱导率的影响

Table 3 Effects of 2, 4–D on callus induction rate of Kasalath seed

质量浓度/(mg·L^{-1})	接种的种子数/粒	诱导出愈伤的种子数/粒	愈伤组织诱导率/%
0.5	60	5±1	(7.8±1.9)E
1	60	12±2	(20.0±3.7)D
1.5	60	30±2	(50.3±3.8)C
2	60	44±2	(73.8±3.2)B
2.5	60	48±2	(80.8±2.5)A
3	60	44±2	(73.8±3.6)B
10	60	44±2	(73.3±3.5)B
20	60	44±2	(73.0±3.6)B
30	60	43±2	(72.0±3.2)B

表中数据为 5 个重复的平均值。

2.3 工程菌类型及侵染浓度对转化效率的影响

在侵染过程中，如果菌液浓度过高，转基因受体(愈伤组织)容易产生过敏反应，且脱菌时抗生素对农杆菌生长的抑制作用会降低，使愈伤染菌严重而无法继续生长，从而影响转化效率。但菌液浓度过低时，由于附着在愈伤组织表面的菌液太少，导致得不到转化植株[6]。表 4 结果表明，Agl0 的菌液 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15 时转化效率最高，达 65.8%，且脱菌时农杆菌抑制率可达 86.7%；EHA105 菌液的 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15 时，转化效率为 82.0%，脱菌时农杆菌抑制率为 99.0%，高于相同侵染浓度的 Agl0 的转化效率，且脱菌时农杆菌抑制效果较好。EHA105 菌液的 $OD_{600\ nm}$ 为 0.2 时转化效率为 84.3 %，但脱菌时农杆菌抑制率下降至 80.3 %，因此，EHA105 比 Agl0 更适合介导水稻 Kasalath 的遗传转化，且菌液 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15 是最佳侵染浓度。

表 4 不同浓度的 EHA105 和 Agl0 对抗性愈伤率及脱菌时农杆菌抑制率的影响

Table 4 Effect of EHA105 and Agl0 in different concentrations on hygromycin–resistant callus rate and bacteriostasis rate during screening

工程菌菌液 $OD_{600\ nm}$	侵染愈伤数/块	抗性愈伤获得率/%		农杆菌抑制率/%	
		Agl0	EHA105	Agl0	EHA105
0.05	100	(45.1±2.4) B	(44.1±2.2) C	(100.0±0.0) A	(100.0±0.0) A
0.10	100	(59.3±3.1) Ab	(53.7±2.0) Ba	(100.0±0.0) A	(100.0±0.0) A
0.15	100	(65.8±2.0) Aa	(82.0±3.0) A	(86.7±2.0) B	(99.0±0.5) A
0.20	100	(20.3±2.6) C	(84.3±2.5) A	(76.0±2.4) C	(80.3±2.2) B
0.30	100	(0.0±0.0) D	(55.8±2.1) B	(12.0±1.2) D	(36.7±1.5) C
0.40	100	(0.0±0.0) D	(47.6±2.2) Cb	(0.0±0.0) E	(3.7±0.5) D

表中数据为 3 个重复的平均值。

2.4 共培养时间对转化的影响

本研究的结果(表 5)表明，对于水稻 Kasalath，愈伤组织经农杆菌侵染后，共培养时间以 3 d 为最佳。此时，农杆菌聚集在愈伤组织底部，表面看不

表 5 共培养时间对转化的影响

Table 5 Effect of co–cultrue time on transformation

共培养时间/d	共培养结束时农杆菌的生长情况	转化效率/%	农杆菌的抑制率/%
1	几乎不见农杆菌生长	(33.7±1.9) C	(100.0±0) A
2	愈伤底部偶尔可见菌液	(50.5±2.3) B	(100.0±0) A
3	在愈伤底部有明显菌液	(82.0±2.6) A	(99.0±0.1) A
4	愈伤底部菌液多	(25.4±3.8) D	(50.8±4.5) B
5	农杆菌几乎包裹整个愈伤	(0.0±0.0) E	(6.4±2.6) C

表中数据为 3 个重复的平均值。

出农杆菌的生长痕迹。共培养少于 3 d 的愈伤组织转化效率低，而多于 3 d 时，在后期的筛选过程中很难抑制农杆菌的生长，导致愈伤组织死亡率上升，转化效率也显著降低。

2.5　愈伤组织分化前干燥处理对植株再生频率和成苗速度的影响

由表 6 可见，快速干燥脱水 6~8 h 的植株再生频率均较高，快速干燥脱水 8 h 的愈伤分化成苗的速度较快；慢速干燥 48~72 h 的植株再生频率较高，且成苗速度较快。基于快速干燥 8 h 和慢速干燥 72 h 3 种处理方式效果差异不大，为缩短遗传转化时间，降低污染的发生，可以选择快干 8 h 处理。

表 6　干燥处理 Kasalath 愈伤组织对植株再生频率和成苗速度的影响

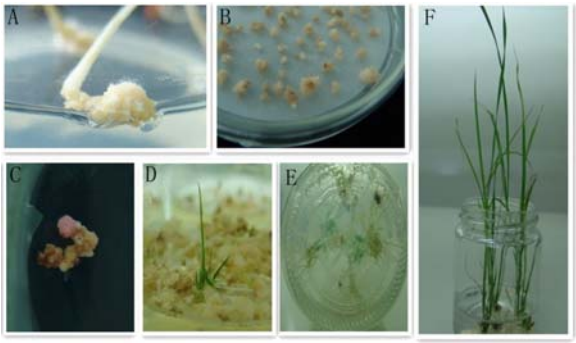
Table 6　Effect of dehydration to Kasalath callus on the frequency and speed of plant regeneration

干燥方式	时间/h	再生频率/%	成苗时间/d
快速干燥	0	(32.67±2.52) D	(25.33±1.15) D
	2	(46.00±3.00) C	(20.67±1.53) C
	4	(68.67±3.79) B	(16.67±0.58) B
	6	(90.33±4.51) A	(13.67±0.58) Ab
	8	(90.67±4.93) A	(11.33±0.58) Aa
	10	(70.67±5.13) B	(10.67±1.15) Aa
	12	(66.33±5.03) B	(13.33±0.58) Ab
慢速干燥	0	(33.33±2.31) D	(25.67±1.53) C
	24	(75.33±3.79) C	(15.67±1.15) Bc
	48	(91.00±1.73) A	(13.33±0.58) Bb
	72	(90.67±1.15) A	(10.67±0.58) Aa
	96	(83.33±2.08) B	(13.00±1.00) Ab

表中数据为3个重复的平均值。

此外，本研究的结果还表明，预培养和预分化处理对抗性愈伤转化效率和植株再生频率的影响效果不明显(数据未列出)，因此，为了缩短遗传转化时间，可省略此 2 个步骤。

综上所述，快速高效的 Kasalath 遗传转化的技术流程如图 1。从愈伤组织诱导至遗传转化获得再生植株全过程只需 57～60 d，即：选择新鲜种子进行愈伤诱导(图 1–A，7~10 d)，用携带目的片段的菌液 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15～0.2 的 EHA105 与愈伤组织共培养(图 1–B，3 d)，侵染后于筛选培养基上培养(图 1–C，约 20 d)，第 2 次筛选(约 5 d)，将抗性愈伤快速干燥脱水(8 h)，转入分化培养基培养(图 1–D)，10 d 即可长出再生苗(图 1–E)，将再生苗转入生根培养基培养 5 d，生根后温室炼苗(图 1–F)7 d 即可转入自然土壤中栽培。



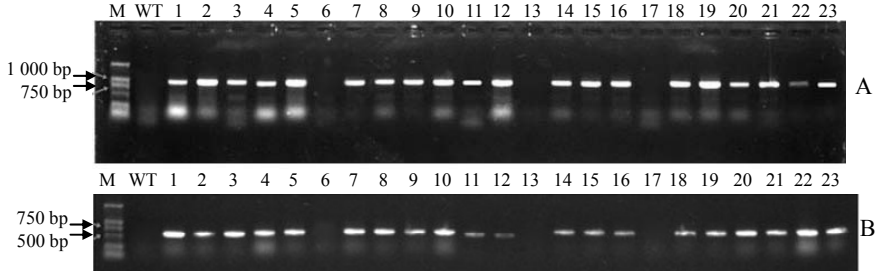
A　诱导；B　共培养；C　筛选；D　分化；E　生根；F　炼苗。

图 1　水稻Kasalath愈伤组织的诱导与农杆菌介导的遗传转化

Fig. 1　Callus induction and *Agrobactorium*-mediated transformation of *Indica* rice Kasalath

2.6　转基因植株的 PCR 鉴定

随机挑取 23 株 T_0 代 *IPS1* 转基因植株的叶片提取 DNA，以野生型植株作为阴性对照，分别进行了 *GCS–IPS1* 的嵌合片段和 *HPT* 的 PCR 检测，结果分别见图 2–A 和图 2–B。结果显示 23 株中有 20 株植物的 DNA 均能扩增出目的条带，表明目的基因已



M 为 AL 2 000 DNA Marker；A 中 1~23 用 *GCS–IPS1* 嵌合片段的引物对转基团植株进行 PCR 检测的结果，WT 用 *GCS–IPS1* 嵌合片段的引物对野生型植株的检测结果；B 中 1~23 用 *HPT* 的引物对转基因植株进行 PCR 检测的结果，WT 用 *HPT* 的引物对野生型植株的检测结果。

图 2　T_0 代转基因植株的 *GCS–IPS1* 的嵌合片段和 *HPT* 的 PCR 鉴定结果

Fig.2　PCR detection for the chimeric fragment of target *GCS–IPS1* and the *HPT* of T_0 transgenic plants

经整合到植物基因组中，阳性转基因植株获得率为 87.0%。统计结果表明，从侵染愈伤组织至获得阳性突变体再生植株，其遗传转化效率为 65%。

3 讨 论

典型的籼稻，如 Nanjing 11、IR64、IR72 等的愈伤组织诱导和遗传转化都比较困难[2]。田文忠等[10]的研究认为，在诱导培养基中同时添加 BAP、Zeatin、Zip 和 TDZ 与 2,4–D，或单独添加 TDZ 皆可以明显地改进籼稻 TN1、IR64、IR72 的愈伤组织质量，从而提高植株再生频率[11]。有很多植物，如超级杂交稻父本 0293[12]和五节芒[13]等的愈伤组织诱导培养基中添加了 2,4–D 和 6–BA，但多数粳稻(如日本晴等)愈伤组织诱导培养基中，通常只添加 2,4–D[2, 4]。在此基础上，笔者探讨了不同质量浓度 2,4–D 对 Kasalath 愈伤组织诱导的影响，结果表明，2.5 mg/L 2,4–D 的诱导效果最好，获得了高于 80% 的愈伤组织诱导率，且愈伤组织质量好，适合遗传转化和植株再生，因此，在愈伤组织诱导培养基中添加适当浓度的 2,4–D 是必要的。为节约成本，可以不加其他植物生长物质。

农杆菌侵染愈伤组织转导目的基因时，除了选择高质量的愈伤组织外，合适的菌株也很重要。比如，易自力等[11]和柳红等[14]比较农杆菌 LBA4404、EHA105、AGL1 对多个籼稻品种的转化效果时发现，EHA105 对受体的敏感性高于 LBA4404 和 AGL1，转化效果较好[11,14]。本研究中，笔者比较了 EHA105 和 Agl0 对籼稻 Kasalath 愈伤组织的转化，从筛选时抗性愈伤获得率和农杆菌抑制率 2 个指标来评价，两者的菌液工作浓度均以 $OD_{600\ nm}$ 为 0.15 时效果最好，且 EHA105 的转导效率优于 Agl0。EHA105 对于籼稻 Kasalath 的遗传转化可能是一个比较合适的菌株。

很多研究表明，在分化处理前，对愈伤组织进行适当干燥脱水处理能明显提高愈伤组织的分化能力[10]。比如，H. Mathews 等[15]研究发现干燥处理木薯的愈伤组织植株再生频率可达 83%，远远高于未经干燥处理的植株再生频率(2%)。秦文娟等[16]研究表明，干燥处理在提高玉米愈伤组织生长量方面效果非常好，各基因型反应一致，且易于操作，能极显著提高愈伤组织生长量，从而加快愈伤组织生长，提高植株再生频率。Masayoshi 和 Takayasu[17]报道了用简单的脱水处理法促进粳稻愈伤组织的植株再生；田文忠[10]将此法用于籼稻 TN1、IR72 和 IR64，也得到了类似结果。高三基等[18]的研究表明，脱水处理对成熟胚愈伤组织分化率的影响在不同基因型之间存在较大差异，比如愈伤组织脱水处理 2、4 d 均能提高愈伤组织绿苗的分化频率，对难分化的品种 R527、优 99 和明恢 86 效果更为明显，其分化频率提高 1.1～5.7 倍；对未经脱水处理就可达到较高植株再生频率的明恢 81、N175、航 1 号，脱水处理后植株再生频率提高 10.7%～21.2%。曾桂萍[1]等对 R527 的研究结果表明，分化前的干燥处理有利于愈伤组织变绿和减少褐化率，但不利于成苗，这与高三基等[18]的结果不同所致，其原因可能是他们使用的培养基成分不同所致。本研究结果表明，干燥脱水处理后的 Kasalath 愈伤的分化能力有显著提高(为对照的 3 倍)，且加快了分化成苗的速度(提前 2 周出现幼苗)，推测干燥脱水处理后，较低含水量的愈伤组织可能对分化处理更敏感，从而有利于愈伤组织分化成苗，但其内在的生理机制仍有待进一步研究。

植物转基因技术受许多因素影响。要建立高效的遗传转化体系，需要针对特定植物种类或组织，对遗传转化流程的条件进行优化。农杆菌介导的籼稻从愈伤组织诱导到遗传转化再生苗的获得，一般耗时在 3 个月左右[11,14,19]；籼稻 Kasalath 从诱导愈伤组织到新生苗移栽入土壤需 70 d[2]。本研究结果表明，完成高效遗传转化过程的时间只需约 57～60 d。

参考文献：

[1] 曾桂萍，余显权，刘仁祥，等．提高籼稻愈伤组织分化频率的研究[J]．贵州农业科学，2004，32(3)：12–13．

[2] Hiei Y，Komari T．*Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed[J]．Nature Protocols，2008，5(3)：824–834．

[3] Saika H，Toki S．Mature seed-derived callus of the modelindica rice variety kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation[J]．Plant Cell Rep，2010，29：1351–1364．

[4] Wang W X，Zhang J C，Liu X Q，et al．The factors of

genetic transformation for indica rice kasalath[J]. Agricultural Science & Technology，2009，10(6)：29–32．

[5] 肖向文．农杆菌介导的籼稻遗传转化研究[D]．重庆：西南农业大学农学院，2005．

[6] 王歆，于恒秀，曾燕楠，等．农杆菌介导籼稻中籼 3037 转化体系的优化及其应用[J]．分子植物育种，2008，6(3)：457–464．

[7] Saini R，Jaiwal P K．*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blackgram： An assessment of factors influencing the efficiency of uidA gene transfer[J]．Biologia Plantarum，2007，51 (1)：69–74．

[8] Sanyal I，Singh A K，Amla D V．*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) using mature embryo axes and cotyledonary nodes[J]．Indian Journal Biotechnology，2003，2(4)：524–532．

[9] Dan Y H，Baxter A，Zhang S，et al．Development of efficient plant regeneration and transformation system for impatiens using *Agrobacterium tumefaciens* and multiple bud cultures as explants[J]．BMC Plant Biology，2010，10：165–177．

[10] 田文忠，Iann Rance，Elunialai Sivamani，等．提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]．遗传学报，1994，21(3)：215– 221．

[11] 易自力，曹守云，王力．提高农杆菌转化水稻频率的研究[J]．遗传学报，2001，28(4)：352–358．

[12] 成平，陈锦，袁定阳，等．植物抗病基因 *snc1* 在超级杂交稻父本 0293 中的遗传转化[J]．湖南农业大学学报：自然科学版，2012，38(3)：267–270．

[13] 周玥玥，陈智勇，黄丽芳，等．五节芒离体再生与多倍体诱导技术体系的建立[J]．湖南农业大学学报：自然科学版，2012，38(5)：487–490．

[14] 柳红．籼稻高效遗传转化体系的建立[D]．福州：福建农林大学生命科学学院，2009．

[15] Mathews H，Schopke C，Carcamo R．Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava [J]. Plant Cell Rep，1993，12：328–333．

[16] 秦文娟，胡彦民，邓士政，等．山梨醇和干燥处理对玉米愈伤组织生长的影响[J]．河南科学，2009，27(4)：422–425．

[17] Masayoshi T，Takayasu H．Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus [J]．Plant Cell Reports，1992，11：550–553．

[18] 高三基，陈如凯，马宏敏．影响籼稻成熟胚愈伤组织植株再生频率的几个因素[J]．作物学报，2004，30(12)：1254–1258．

[19] 王维旭，张骥诚，刘学群，等．籼稻品种 kasalath 遗传转化条件的研究[J]．安徽农业科学，2010，38(4)：1735–1737．

责任编辑：罗　维
英文编辑：罗　维