

# 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化研究进展

王兰, 田华\* (华南农业大学农学院, 广东省分子育种重点实验室, 广东广州 510642)

**摘要** 系统介绍了根癌农杆菌介导水稻遗传转化的发展历史、影响遗传转化的因素、侵染愈伤组织的方式及转基因植株的后代分析等, 并探讨了水稻遗传转化的应用前景及存在的问题。

**关键词** 水稻; 农杆菌; 遗传转化

**中图分类号** S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)30-14594-03

## Progress in Genetic Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in Rice

WANG Lan et al (Key Laboratory of Plant Molecular Breeding of Guangdong Province, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642)

**Abstract** The rice genetic transformation methods mediated by *Agrobacterium tumefaciens* including the developing history, influence factors, infection ways, genetic analysis of the transgenic plants were introduced, and the existing problems and its prospect of application were also discussed.

**Key words** Rice; *Agrobacterium*; Genetic transformation

随着基因工程和农业生物技术的发展, 遗传转化成为水稻遗传改良的一种重要辅助手段, 受到全世界水稻育种家的青睐。遗传转化的方法很多, 目前大体上分为 3 类: ①农杆菌介导法; ②以原生质体或细胞(组织)作为受体的直接基因转移, 如基因枪法 (particle bombardment, PB)、聚乙二醇法 (PEG)、电击法 (EP, electroporation)、脂质体法 (Lip, Lome)、磷酸钙-DNA 共沉淀法 (Ca-P)、微注射法 (Mi, Microinjection)、超声波法 (Ultrasound); ③种质系统介导基因转化, 如花粉管通道法、生殖细胞浸泡法和胚囊、子房注射法。上述方法大多数须具备相应的细胞悬浮系或原生质体受体系统或贵重的仪器设备, 且遗传机制不清楚, 因此, 其应用受到一定程度的限制。而农杆菌是一种寄主广泛的土壤细菌, 自然状态下能通过原有病斑或伤口侵染植物, 将载体上特定区域内 (T-DNA) 的目的基因导入细胞, 并整合在植物染色体上。该方法仪器设备简单, 操作容易, 且理论和技术操作都较成熟, 转化效率高, 转化植株的遗传稳定性最好, 导入的外源基因拷贝数低, 便于后代遗传分析, 因此被广泛应用。

### 1 根癌土壤杆菌转化水稻的发展历程

自 1978 年 Chilton 等<sup>[1]</sup>及 1979 年 Marton 等<sup>[2]</sup>第一次利用农杆菌 Ti 质粒为载体将 T-DNA 上的胭脂碱基因转入烟草细胞, 并通过分子生物学鉴定了该基因在植物组织中的整合和表达以来, 至今所获得的 54 种转基因植物中 60% 以上是以农杆菌为载体经共培养途径实现的外源基因表达<sup>[3]</sup>。由于水稻不是农杆菌的天然寄主, 对根癌土壤杆菌反应不敏感, 很难被根癌土壤杆菌转化。随着根癌土壤杆菌转化机理的深入阐明和转化方法的不断改进, 人们开始利用该方法转化水稻并获得转化细胞和转基因水稻。1993 年 Chan 首次报道利用根癌土壤杆菌转化梗稻未成熟胚并提供了分子依据<sup>[4]</sup>, 1994 年 Hiei 等又通过根癌土壤杆菌转化梗稻成熟胚诱导形成的愈伤组织获得转基因植株<sup>[5]</sup>, 1996 年一些研究者先后通过根癌土壤杆菌介导法在籼稻和爪哇稻中得到可育

转基因植株<sup>[6-8]</sup>。此后, 该方法介导的水稻遗传研究迅速发展, 并显示出广阔的应用前景。

### 2 影响农杆菌介导转化水稻的因素

**2.1 水稻基因型** 基因型是影响水稻遗传转化的主要因素之一, 不同的基因型, 转化的难易程度不同。一般来说, 粳稻易转化成功, 转化频率高, 籼稻转化较困难, 成功率低, 这主要与籼稻愈伤组织形成、继代和再生植株困难等因素有关<sup>[9-10]</sup>。易自力等对不同的籼稻和粳稻品种进行转化, 结果表明, 籼稻品种在 3 种培养基 (CC、NB、MS) 上的平均出愈率为 67.2%, 平均分化率为 42.0%; 而粳稻品种平均出愈率为 88.7%, 分化率为 62.5%<sup>[11]</sup>。另外, 籼型品种内不同的基因型, 其转化率也不同, 刘元风等报道矮秀占、粤香占、茉莉新占和绿黄占 4 种籼型品种在相同的培养条件下, 茉莉新占的转化率最高, 达 62.5%, 而粤香占最低, 只有 18.1%<sup>[12]</sup>。

**2.2 转化受体** 在水稻遗传转化中, 通常采用幼嫩种子、幼胚、成熟胚和成熟种子等易于培养的外植体, 而转化受体则采用来源于幼嫩种子、幼胚、成熟胚和成熟种子生长旺盛的胚性愈伤组织。但不同外植体来源的愈伤组织的转化率存在很大差异。

陈惠等研究了在相同的诱导培养基上培养的 4 种外植体 (幼嫩种子、幼胚、成熟胚和成熟种子) 的诱导率, 结果表明, 幼胚和成熟胚可以高频诱导产生大量的愈伤组织<sup>[13]</sup>。Vijayachandra 等研究水稻不同组织 (细胞) 对农杆菌 Vir 基因的诱导, 在盾片、幼胚等外植体与农杆菌 EHA105/pCAM-BIA1301 共培养后的瞬间表达率中, 预培养 4 d 的幼胚的瞬间表达率最高 (中花 11 号为 90%, 申湘粳 4 号为 40%)<sup>[14]</sup>。黄健秋等采用未成熟胚来源的愈伤组织进行根癌农杆菌转化, 其转化频率均高出成熟胚来源的愈伤组织的转化频率 1~2 倍<sup>[15]</sup>。因此, 幼胚和成熟胚都能高频诱导出愈伤组织, 幼胚来源的愈伤组织比成熟胚来源的愈伤组织转化频率高。另外, 用幼胚作起始材料还可以大大缩短培养时间, 因为幼胚经 3~5 d 培养后所得的愈伤组织就可以作为转化的受体, 而成熟盾片要经过 30~50 d 培养得到的愈伤组织才适合做转化的受体<sup>[16]</sup>。幼胚来源受季节限制且易被污染, 而成熟胚虽然转化频率低, 但可以全年使用且污染率低。

**基金项目** 国家自然科学基金青年基金项目 (30800597); 广东省自然科学基金博士启动项目 (8451064201001015)。

**作者简介** 王兰 (1975 -), 女, 湖南洞口人, 博士, 讲师, 从事水稻分子遗传学研究。\* 通讯作者。

**收稿日期** 2009-06-22

**2.3 愈伤组织的继代培养时间** 愈伤组织经过多代培养后会产生体细胞突变,不利于转化体的筛选。同时,多代培养后,愈伤组织逐渐衰老死亡,将大大降低转化效率。陈惠等认为继代2~4次后的转化效率较高,其中继代4次后的愈伤组织,其抗性愈伤(抗性愈伤数/侵染愈伤数)转化率为71.4%,抗性植株株系(抗性株系数/侵染愈伤数)为47.6%<sup>[13]</sup>。广东省分子育种重点实验室挑选继代2~3次后颗粒状、致密、中等大小的愈伤组织或成熟胚诱导出的愈伤进行转化,转化效率均很高。因此,笔者认为作为转化受体的愈伤组织,继代次数不能太多,继代时间不能太长,只要愈伤组织的状态很好,均能提高转化效率。

**2.4 农杆菌的浓度** 农杆菌的浓度直接影响转化效率。农杆菌浓度太低,每个愈伤组织块产生的抗性愈伤数很少;浓度太高,愈伤组织易被过度侵染,共培养后无法恢复活力,在进行选择培养时,大多数会褐化死亡。郑杰通过使用不同OD值的农杆菌菌液侵染生长状况良好的愈伤组织,结果表明,OD<sub>600</sub>值为0.145~0.190时,转化效率最好,基本保持在79%左右<sup>[17]</sup>。陈惠等认为OD<sub>600</sub>值为0.5的农杆菌侵染液也能达到很好的转化效果<sup>[13]</sup>。广东省分子育种重点实验室所使用的农杆菌侵染液的OD<sub>600</sub>值为0.2~0.4,对于不同的转化材料,其转化效率均很好。因此,笔者认为农杆菌的侵染浓度与愈伤组织的生长状态有关,对于生长良好的愈伤,OD<sub>600</sub>值最好在0.2~0.4时进行转化,既能提高转化效率,又可减少转化株的假阳性。

**2.5 供选择的标记基因和农杆菌筛选剂** 在农杆菌转化中,转化体的筛选是一个重要的环节,成功的筛选能有效地区分转化与非转化的愈伤组织,并产生较少的假阳性。在农杆菌筛选中,成功的筛选主要体现在合适的选择标记基因与筛选剂、适当的筛选浓度与筛选时间。

在水稻的遗传转化中,目前使用最多的抗生素抗性酶基因有NPT II基因(产生新霉素磷酸转移酶,抗卡那霉素、庆大霉素衍生物、巴龙霉素、新霉素)、HPT基因(产生潮霉素磷酸转移酶,抗潮霉素)、bar基因(产生乙酰转移酶,抗Basta、Bialaphos或Glufosinate等除草剂)等。根据所用筛选标记基因的不同,常用潮霉素(Hyg)、庆大霉素衍生物(G418)和PPT(phosphinothricin,除草剂Basta等的有效成分)等作为转化受体筛选剂。由于加入的抗生素和除草剂可能影响愈伤组织的分化和植株再生,需要对各种筛选剂进行比较和筛选。易自力等比较了以上3种筛选剂的作用效果,结果表明,籼稻品种的筛选以G418 150~200 mg/L、Hyg 30~40 mg/L、PPT 10~20 mg/L为宜,粳稻品种的筛选以G418 200~250 mg/L、Hyg 40~50 mg/L、PPT 20~30 mg/L为宜<sup>[11]</sup>。周玲艳等比较了潮霉素和PPT对愈伤组织的筛选效果,与易自力等的结果基本一致,即粳稻品种以Hyg 50 mg/L、PPT 30 mg/L,籼稻品种以Hyg 50 mg/L、PPT 10 mg/L较合适<sup>[18]</sup>。从筛选的时间来看,同一浓度下的筛选时间越长,筛选效果越明显。在上述浓度下,G418的筛选时间以50 d左右为宜,Hyg以40 d左右为宜,PPT以50~60 d为宜<sup>[11]</sup>。

水稻愈伤组织受到筛选剂抑制后,所表现出来的外部特征也是不同的:对Hyg的反应是干枯、发黑;对PPT的反应前

期不明显,后期发黄、发褐;对G418的反应是发灰,失去光泽。因此,用Hyg做筛选剂最易判别愈伤组织产生抗性与否。

**2.6 其他影响** 农杆菌介导转化虽然操作简单,但操作过程的每一个环节均会影响转化效率,除上面介绍的几种主要因素外,还存在一些其他影响因素,如组织培养条件、共培养时间、载体的类型、农杆菌菌株、Hyg的筛选浓度等。

共培养阶段加入活化Vir区基因的酚类化合物,包括作用较强的乙酰丁香酮(AS)、羟基乙酰丁香酮(OH-AS)、没食子酸等,均能提高转化效率。Ramesh等用携带超双元质粒载体pTOK233的农杆菌侵染籼稻愈伤组织时,在共培养前加入乙酰丁香酮和未加入乙酰丁香酮的结果差异很大,加入乙酰丁香酮后,所用的6个籼稻品种的gusA基因瞬时表达率都大幅度提高,不同品种的增长率为64.28%~133.33%。不同的酚类化合物对转化率的提高能力不同<sup>[19]</sup>。刘明志等发现以乙酰丁香酮为添加剂比没食子酸有效,认为这2种酚类化合物激活毒性基因的表达机理不同,乙酰丁香酮通过VirA和VirG 2个基因调节表达系统,激活毒性区上其他毒性基因的表达<sup>[20]</sup>。

共培养时间长短会影响农杆菌的吸附和T-DNA的转移。一般共培养2~3 d能使农杆菌T-DNA转化到水稻愈伤组织,处理时间过长会导致愈伤组织变褐而丧失分化力。但共培养时间的长短与转化受体有关。王敬乔等认为,共培养5 d适合于农杆菌转化日本晴愈伤组织<sup>[21]</sup>。但杨长登等认为,籼稻单倍体微芽Hu18在与农杆菌菌株LBA4404共培养4~5 d后未出现转基因植株,6 d后才诱导了T-DNA的有效转移,共培养7 d的转化频率更高<sup>[22]</sup>。

### 3 农杆菌侵染愈伤组织的方式

农杆菌介导的水稻转化中常用共培养法。共培养前农杆菌侵染水稻愈伤组织有以下几种方式:①将整块愈伤组织浸泡于菌液中静置培养;②将整块愈伤组织浸泡在菌液中摇动培养;③将菌液滴加到愈伤组织上。通常使用的是第一种方式,易自力等认为,第二种方式转化效果最好,这很可能是浸泡并摇动能使细菌与组织块更充分接触而有利于感染作用的进行<sup>[11]</sup>。另外,适宜的侵染时间也是转化成功的关键,如果侵染时间过短,会使农杆菌难以附着在愈伤组织上;如果时间过长,会导致农杆菌过度繁殖,这不仅为下一步除菌带来困难,而且也对愈伤组织造成伤害。广东省分子育种重点实验室研究表明,侵染20 min,转化效果较好。

### 4 转基因植物的后代遗传分析

确定外源基因是否已整合到植物染色体上,一般是对转基因植株进行PCR分析和Southern杂交分析。因为转进植物染色体上的基因包括外源基因和标记基因HPT,所以可以对转基因植株进行PCR扩增,并以非转基因植株DNA为对照,通过琼脂糖电泳比较分析外源基因的表达情况;或酶切转基因植株DNA,以HPT基因的特异引物扩增片段作探针进行Southern杂交,进一步检测外源基因在受体基因组中整合的拷贝数。

农杆菌介导的转基因植株中外源基因拷贝数大多为1~5个,但也有高达几十个的报道。翟文学等利用农杆菌介导将白叶枯病抗性基因Xa21转入水稻中发现该基因整合为

单拷贝或双拷贝<sup>[23]</sup>。唐微通过农杆菌介导转化 *Bar* 基因进入水稻,获得转化株的拷贝数为 1~6 个<sup>[24]</sup>。转入水稻的外源基因一般呈显性传递给后代,其遗传方式有的按孟德尔遗传分离规律,自花授粉后代表现为 3:1 分离规律,与非转化亲本杂交后代表现为 1:1 分离规律<sup>[5]</sup>。因此在多拷贝基因中,只有一个拷贝具有表达功能,或者所有表达的拷贝整合在受体染色体基因组中的一个位点;有的按非孟德尔方式<sup>[25]</sup>,外源基因按孟德尔方式传递到自交 T<sub>2</sub> 代纯合的转基因植株即可被确认,但由于外源基因的失活、纯合致死效应、花粉致死效应以及其他未知原因,会导致外源基因不按孟德尔方式遗传,到自交 T<sub>2</sub> 代得不到纯合的转基因植株。

## 5 根癌土壤杆菌转化水稻的应用前景

应用根癌土壤杆菌转化水稻,将水稻所不具备的外源基因导入其中,改良了水稻的某些目的性状,获得了一些具有高产、优质、抗逆和抗病虫等品质的新品种,有力地促进了水稻育种的发展。

**5.1 抗虫方面** 先后有苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)、 $\delta$ -内毒素基因 [*CryIA(a)* 和 *CryIA(c)*]、蛋白酶抑制剂基因 (*Pin2*、*SKTI*、*OC-I*、 $\Delta$ *D86*、*CPTI*)、植物雪花莲凝集素基因 (*GNA*) 导入水稻获得转基因植株,使水稻产生对二化螟虫、三化螟虫、稻纵卷叶螟等鳞翅目害虫及蝗虫、褐飞虱、线虫的抗性。目前,应用最广泛的抗虫基因是 Bt 毒蛋白基因,其表达产物与昆虫肠道上皮纹缘细胞上的受体位点结合,引起并破坏纹缘膜细胞渗透压的平衡,使细胞裂解,对昆虫产生特异杀伤作用。由于转基因 *Bt* 基因植物抗虫谱较窄,目前人们在积极探索同时转入多个抗性基因进行抗虫分子育种的研究,如卫剑文等将 *Bt* 和 *SBTi* 2 个基因同时转入水稻,可提高转基因植株的抗虫性和扩大其抗虫谱<sup>[26]</sup>。

**5.2 抗病方面** 几丁质酶基因导入水稻后,对水稻真菌病害如纹枯病产生抗性;*Xa21* 基因、抗菌肽基因转入水稻后,对白叶枯病、细菌条斑病的抗性明显增加。水稻东格鲁球状病毒 (RTSV) 和杆状病毒 (RTBV) 的外壳病毒也被克隆并应用于水稻东格鲁病的研究<sup>[27]</sup>。

**5.3 品质改良方面** 目前已分离出大量抗逆相关基因并应用于水稻的遗传转化。如 Yokoi 等将来源于拟南芥的丙三醇-3-磷酸-脂酰基转移酶基因 (*GPAT*) 的 cDNA 转入水稻中,大大提高了水稻不饱和脂肪酸的含量和光合作用<sup>[28]</sup>。殷丽青等将反义蜡质基因导入水稻,获得稻谷胚乳中直链淀粉含量降低的转基因植株<sup>[29]</sup>。

**5.4 抗除草剂方面** *Bar* 是水稻抗除草剂转基因研究中的应用最多的一个基因。因为 *Bar* 基因的表达既能抗除草剂,作为非选择性除草剂被广泛使用,在植物遗传转化中又常作为标记基因使用,所以涉及的领域最广,取得的成效也最明显。

## 6 水稻根癌土壤杆菌介导法研究中存在的问题

(1) 基因型的依赖性问题。由于水稻不同品种间的遗传差异很大,转化效率也不同,所以在进行转化时,必须对受体材料进行充分的考虑和选择,针对不同的材料,采用不同的转化技术体系。

(2) 基因沉默与失活问题。虽然根癌土壤杆菌介导的基因转化,其后代发生基因沉默的现象较其他方法低,但转基

因水稻在连续的世代中仍约有一半失活或沉默,使目的基因的高效表达较困难。近年来,人们针对基因沉默的原因,采取不同的措施来克服。如构建细胞核基质支架附着区 (Matrix attachment region, MARs) 以提高转基因的稳定性和表达效率,取得了一定的效果<sup>[30]</sup>;用 5-氮胞嘧啶处理植株抑制甲基化和脱甲基化<sup>[31]</sup>。

(3) 转基因的安全问题。除目的基因的安全性外,标记基因的安全性也是个潜在的问题。对于水稻目的基因的安全性,许多研究者致力于寻求抑制基因漂移的有效办法。对于标记基因的安全问题,目前主要是使用无标记基因的转基因系统或共转化系统,即标记基因和目的基因分别插入两段 T-DNA,并以非连锁形式导入植物,然后通过两轮筛选最后得到带有转化的目的基因而去掉标记基因的转基因植株。

尽管目前根癌土壤杆菌转化水稻的研究仍存在以上诸多问题,相信随着人们对根癌土壤杆菌研究的进一步深入和整合机制的进一步阐明,根癌土壤杆菌转化水稻必将取得更大进展,在生产上发挥更重要的作用。

## 参考文献

- [1] CHILTON M D, SAIKI R K, YADAY N, et al. Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumours[J]. *Nature*, 1978, 275:147-149.
- [2] MARTON L, WULLENA G J, MOLENDIJK L, et al. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature*, 1979, 277:129-132.
- [3] 贾士荣, 曹冬孙. 转基因植物[J]. *植物学通报*, 1992, 9(2):3-15.
- [4] CHAN M T, CHANG H H, HO S L, et al. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimerical  $\alpha$ -amylase promoter/ $\beta$ -glucuronidase gene[J]. *Plant Mol Bio*, 1993, 22:491-506.
- [5] HIEI Y, OHTA S, 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]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2):271-282.
- [6] ALDEMITA RR, HORDGES T K. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Japonica* and *Indica* rice varieties [J]. *Planta*, 1996, 199:612-617.
- [7] JINJIANG D, WEIMIN T, WALLACE G B, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Japonica* rice [J]. *Mol. Breed*, 1996, 2:267-276.
- [8] RASHID H, YOKOI S, TORIYAMA K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15:757-830.
- [9] 高振宇, 黄大年. 影响水稻愈伤组织形成和植株再生能力的因素 [J]. *植物生理学通报*, 1999, 35(3):227-230.
- [10] CHAUHAN R S, SINGH B M. High frequency callusing and regeneration from immature embryos of blast resistant indica rice cultivars [J]. *Rice Biotechnology Quarterly*, 1995, 23:10.
- [11] 易自力, 曹守云, 王力, 等. 提高根癌土壤杆菌转化水稻频度的研究 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(4):352-358.
- [12] 刘元凤, 刘颜卓, 王金花, 等. 根癌农杆菌介导水稻遗传转化影响因素研究 [J]. *分子植物育种*, 2005, 3(5):737-743.
- [13] 陈惠, 赵原, 种康. 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统 [J]. *植物学通报*, 2008, 25(3):322-331.
- [14] VIJAYACHANDRA K, PALANICHELVA M K, VELUTHAMBI K. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(1):125-133.
- [15] 黄健秋, 卫志明, 安海龙, 等. 根癌土壤杆菌介导的水稻高效转化和转基因植株的高频再生 [J]. *植物学报*, 2000, 42(11):1172-1178.
- [16] 曹明霞, 卫志明, 黄健秋. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化 [J]. *植物生理学通讯*, 2002, 38(5):423-427.
- [17] 郑杰. 农杆菌介导的高效水稻遗传转化体系的研究 [J]. *湖南农业科学*, 2008(2):6-7, 10.
- [18] 周玲艳, 姜大刚, 吴豪, 等. 潮霉素和 PPT 对水稻愈伤组织筛选效果的比较 [J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2003, 16(2):10-15.
- [19] RAMESH S, NAGADHARA D, REDDY V D, et al. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Science*, 2004, 166:1077-1085.

mg/L)时无褐变。C因子(GA<sub>3</sub>)的不同水平愈伤组织诱导率差异较大,高浓度(0.3 mg/L)比低浓度的2个处理诱导率高22.2%~32.1%;长势与浓度(在0.1~0.3 mg/L内)的高低

无关;褐变程度有随浓度增加而逐步减轻的趋势。因此各激素的最佳组合应为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>(即2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.3 mg/L GA<sub>3</sub>)。

表2 不同处理的组织分化状况

Table 2 Tissue differentiation status with different treatments

处理 Treatment	愈伤组织试管数 Tube numbers of callus tissue	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus tissue	愈伤组织长势 Growth vigor of callus tissue	褐变程度 Browning degree	污染管数 Pollution tube numbers
1 A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub>	14	51.9	好	较重	1
2 A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	5	17.8	较好	重	0
3 A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	20	80.0	差	较轻	3
4 A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub>	22	84.6	较好	轻	2
5 A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	16	57.1	一般	轻	0
6 A <sub>2</sub> B <sub>3</sub> C <sub>3</sub>	7	29.2	差	无	4
7 A <sub>3</sub> B <sub>1</sub> C <sub>3</sub>	19	70.4	较好	无	1
8 A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	9	33.3	较好	无	1
9 A <sub>3</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	10	38.5	较好	无	2

表3 各因子水平愈伤组织诱导情况分析

Table 3 Induced situation analysis of callus tissue of each factor level

因子水平 Factor level	A		B		C	
	愈伤组织试管数 Tube numbers of callus tissue	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus tissue	愈伤组织试管数 Tube numbers of callus tissue	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus tissue	愈伤组织试管数 Tube numbers of callus tissue	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus tissue
K1	39	49.9	55	69.0	30	37.1
K2	45	57.0	30	36.1	37	47.0
K3	38	47.4	37	49.2	55	69.2

### 3 讨论

研究提出了魔芋茎尖组织培养的基础培养基配方为:MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L GA<sub>3</sub> + 30 mg/L 蔗糖 + 6 mg/L 琼脂, pH 6.0。在基础培养基的优化正交试验中,以处理4(A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>)即2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.2 mg/L GA<sub>3</sub>表现最好;因子分析认为各激素的最佳组合应为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>(即2.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.3 mg/L GA<sub>3</sub>)。

### 参考文献

- [1] 马崇坚,彭诚聪. 魔芋块茎组织培养及植株再生[J]. 江苏农业科学, 2007(3):110-112.
- [2] 胡建斌. 魔芋组织培养与细胞工程[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3): 379-383.
- [3] 马林,张玲,李卫锋. 影响魔芋愈伤组织形成的几个因素[J]. 广西植物, 2003, 23(6):553-557, 576.
- [4] 鲁红学,胡桂香,周焱,等. 花魔芋组织培养初步研究[J]. 长江大学学报:自然科学版, 2005(5):52-54, 111.
- [5] 吴金平. 利用离体培养技术筛选魔芋软腐病抗源材料的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2004.
- [6] 谢玲玲,赵青华,降巧龙. 魔芋茎尖脱毒试管苗培养基的筛选[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(34):14891

(上接第14596页)

- [20] 刘明志. 酚类化合物促进含双元载体农杆菌对胡萝卜悬浮细胞的转化和植株再生[J]. 植物学报, 1996, 38(3):203-208.
- [21] 王敬乔,李根泽,曾黎琼,等. 用农杆菌共培养法将雄性不育基因导入水稻的研究[J]. 西南农业学报, 2001, 14(1):13-15.
- [22] 杨长登,唐克轩,吴连斌,等. 农杆菌介导将雪莲凝集素(GNA)基因转入籼稻单倍体微芽的初步研究[J]. 中国水稻科学, 1998, 12(3):129-133.
- [23] 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Xa21转入我国的5个水稻品种[J]. 中国科学(C辑), 2000, 30(2):200-206.
- [24] 唐微. 转基因拷贝数对农艺性状的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32):13991-13992.
- [25] PARK S H, PINSON S R, SMITH R H. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices[J]. Plant Mol Biol, 1996, 32(6):1135-1148.

- [26] 卫剑文,许新萍,陈金婷,等. 应用Bt和SBTi基因提高水稻抗虫性的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5):603-608.
- [27] 章冰,卫志明. 水稻遗传转化技术[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(6):479-485.
- [28] YOKOI S, TSUCHIYA K, TORIYAMA K. et al. Tapetum-specific expression of the *Osg6B* promoter β-glucuronidase gene in transgenic rice[J]. Plant Cell Rep, 1997, 16:363-367.
- [29] 殷丽青,王新其,韩志勇,等. 根瘤土壤杆菌介导反义蜡质基因的水稻遗传转化[J]. 上海交大大学学报:农业科学版, 2001, 19(4):285-289.
- [30] PHILIPPE V, BABARA W, AJAY K, et al. Matrix attachment regions increase transgene expressing levels and stability in transgenic rice plants and their progeny[J]. The Plant Journal, 1999, 18(3):233-242.
- [31] 陈国胜. 植物转基因的沉默机制及克服方法[J]. 河北农业科学, 2008, 12(3):75-76.