

农杆菌介导籼稻遗传转化研究的进展及策略

贾丽娥, 张欣, 吴传银, 万建民

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:近年来,农杆菌介导法转化技术已广泛应用于籼稻遗传转化中。但是对籼稻遗传转化相对困难,由于水稻两个亚种遗传差异大,籼稻对转化反应的基因型依赖性强,愈伤组织诱导及分化率低。本文扼要回顾了农杆菌介导籼稻转化研究的历程,系统介绍了影响籼稻转化的主要因素,分析了农杆菌介导籼稻遗传转化研究中存在的问题,并提出了提高农杆菌介导籼稻遗传转化效率的对策。高效籼稻转化体系的建立可以加速水稻转基因品种改良育种进程,推进水稻功能基因组研究的开展。

关键词:籼稻;遗传转化;农杆菌介导;影响因素

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.04.06

中图分类号:S511.21,Q78

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2011)04-0039-07

Research Progress and Strategy for *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in *Indica* Rice

JIA Li-e, ZHANG Xin, WU Chuan-Yin, WAN Jian-Min

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Recently *Agrobacterium*-mediated transformation of rice has been widely used in *japonica* transformation. However, the transformation of *indica* rice is still difficult, mainly because the induction of embryogenic callus is not routine and the rate of plant regeneration from transformed *calli* is low. There are big genetic differences between these 2 subspecies, and *indica* rice is particularly genotype-dependent. This paper briefly reviewed the history of *agrobacterium*-mediated transformation of *indica* rice and recent progress achieved. It also introduced various factors affecting *indica* rice transformation, analyzed problems existing in its research and provided strategy to improve the efficiency of transformation. The establishment of high efficient *indica* rice transformation system will accelerate the process of applying transformation technology in rice breeding programs and promote the studies on rice functional genomics.

Key words: *Indica* rice; genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated; influential factors

水稻是全球过半人口的主要食物和能量来源。随着世界人口增加、耕地减少、生物与非生物因素胁迫日益严重,水稻生产面临巨大的压力。利用基因工程技术培育新品种,是增加水稻单产、提高水稻总产的出路之一。近年来,作为水稻基因工程的关键技术——水稻遗传转化技术取得了重要突破,并在大部分籼稻中建立了快速、高效、稳定、规模化遗传转化体系。在此基础上,已经将许多重要性状如抗虫、抗病、抗逆、品质改良、发育调控、营养高效利用等外源基因转入水稻中^[1,2]。

籼稻和粳稻是栽培稻的两大亚种,全球80%的稻米生产基于籼稻^[3]。但是籼稻对基因型依赖性强,大部分品种的愈伤组织诱导及分化率低,虽有少量遗传转化的成功报道,总体来说,尚缺乏一套普遍适用的籼稻遗传转化技术,籼稻转化在实际应用中存在诸多的问题和挑战。

1 农杆菌介导的籼稻遗传转化研究历程

农杆菌介导的籼稻遗传转化研究始于1992

收稿日期:2011-03-30;接受日期:2011-05-17

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08010-004)资助。

作者简介:贾丽娥,硕士研究生,研究方向为分子遗传育种。E-mail:change84311@126.com。通讯作者:万建民,教授,主要从事水稻的基因定位、克隆和品种选育等研究工作。E-mail:wanjm@caas.net.cn

年, Chan 等^[4]首次尝试以籼稻 Taichung Native1 的幼根为受体材料, 得到转化的愈伤组织, 经 Southern 分析和酶活检测证明嵌合基因已经整合到愈伤组织中, 但未获得再生植株。1994 年, Hiei 等^[5]采用“双超元”载体和向侵染液中添加乙酰丁香酮等改进措施建立了粳稻的高频农杆菌转化体系, 带动了籼稻遗传转化技术的研究。在此基础上, 相继在 Pusa Basmati I、IR 系列品种、孟加拉籼稻种质及中国不同区域籼稻品种等基因型上获得成功^[6-11]。随后, 研究重点从基因型依赖性弱、易转化类型的籼稻品种^[12-14]转向基因型依赖性强、顽拗型籼稻品种转化体系的建立和优化^[15-18]。Hiei 和 Komari^[17]将侵染后由一个幼胚来源的愈伤组织分割成多个独立的转化个体, 大大提高了转化率, 并提出了一套适合纯籼型 IR24、IR64、IR72 的转化程序。之后, 他们又根据同工酶多态性将籼稻品种分为偏籼型, 籼型, 和纯籼型, 提出基于成熟胚和幼胚为起始材料的适宜不同籼稻类型的一套转化技术流程^[18], 但是, 利用这套流程成功的报道并不多。

为突破基因型对籼稻转化的限制, 研究者们还尝试了非植物组织培养的农杆菌介导转化方法^[19,20]。Lin 等^[20]对籼稻种子穿孔后在真空条件下浸透农杆菌, 经发芽直接获得 T₀代植株而省去组织培养过程。但该方法转化率低, 且种子的胚原基的已经形成, 难以确定 T-DNA 是否整合到分生组织细胞的基因组中, 后代需要大量分子鉴定工作^[21], 因此, 该技术尚难以推广应用。

到目前为止, 还未能找到适合于所有籼稻品种转化的通用平台。因此, 要建立高效稳定的籼稻遗传转化体系仍有许多问题亟待解决, 有必要对影响籼稻转化频率的因素进行深入的研究。

2 农杆菌介导籼稻转化的主要影响因素

农杆菌介导转化水稻受诸多因素的影响。水稻基因型、受体组织的类型与年龄、载体类型、农杆菌菌株、选择标记基因以及不同的组织培养条件等都会影响农杆菌介导水稻转化效率^[22]。

2.1 受体材料的基因型、外植体类型及状态

在影响水稻成功遗传转化的诸多因素中, 基

因型差异是最显著的^[23,24]。一般来说, 基因型导致的水稻培养力差异高低顺序为: 糯稻 > 粳型杂交稻 > 粳籼杂交稻 > 籼型杂交稻 > 籼稻, 但是, 即使同为粳稻、籼稻或者某种类型杂交稻, 不同品种的组织培养力也有很大不同^[25]。Glaszmann^[26]最早根据 1 688 个水稻品种同工酶多态性, 将这些品种分为 6 类基因型 I-VI, 其中 I 类为纯籼型, VI 类为带有粳稻遗传背景的品种, 介于二者之间的分别是籼型、偏籼型、和偏粳型。纯籼型品种, 如 Nan Jin 11、Suewon 258、IR 系列等对组织培养和转化反应都很顽拗^[22], 而带有粳稻遗传背景的偏籼型品种, 如 Basmati 370、Basmati 385、Kasalath 等转化相对容易^[13,27,28], 其中, Kasalath 已被作为籼稻规模化转化的模式品种。

近年来, 一些研究者开展了植物组织培养力的分子机理研究, 将影响水稻胚性愈伤诱导及植株再生能力的 8 个 QTLs 分别定位在第 1、4 和 9 染色体上, 这些位点与不同基因型水稻组织培养性状如愈伤组织的质量、颜色、大小和继代能力等相关^[29-31]。研究发现, 葡萄糖脱氢酶基因 *Os22A* 为水稻胚性愈伤特异性表达的基因, 经转化后, 能使不易分化的水稻品种的再分化能力增强^[32]。利用 QTL 等对控制水稻组织培养再生相关基因进行定位, 发现硝酸还原酶基因 *NiR* 与水稻品种 Kasalath 组织培养高再生性能密切相关, 通过图位克隆技术分离该基因。分子分析表明, *NiR* 基因的表达水平及 *NiR* 的活性是影响水稻植株再生的主要因素, 低再生特性由 *NiR* 的低效表达和低 *NiR* 酶活性引起。将高再生力品种 Kasalath 中 *NiR* 基因导入再生能力差的水稻品种 Koshihikari, 可使后者再生能力明显提高^[33]。这些基因的克隆与利用为改良难以转化的水稻基因型的培养力奠定了基础。

外植体类型也是影响遗传转化成败的重要因素。水稻的成熟胚、幼胚、幼穗、胚芽鞘、叶片、花药和苗尖等分生组织和器官都能用于愈伤组织的诱导, 但是由不同外植体得到的愈伤组织的状态及分化能力也不同^[34]。幼胚和成熟胚是籼稻农杆菌转化常用的两种外植体, 幼胚具有很强的分裂能力, 容易脱分化形成大量胚性愈伤组织, 是农杆菌转化和再生的良好系统^[11,35]。用幼胚来源

的愈伤组织进行农杆菌转化,其转化频率高于成熟胚来源的近 2 倍^[36]。虽然幼胚愈伤组织转化效率较高,但是幼胚取材受生长季节限制且操作时易污染,无法满足常年高通量遗传转化实验的需要;而成熟胚取材不受季节限制、操作简便,可以持续不断地提供转化受体,但转化率较低^[37,38],如果能够解决好诱导和分化困难的问题,利用成熟胚为受体材料将具有广泛的应用前景,因此,近年来的研究多以成熟胚为受体材料。Saika 等^[39]针对籼稻成熟胚诱导愈伤容易褐化和生长速度缓慢等特点,通过高温(32~33℃)、光照等交替培养,选用培养 7~10 d 的成熟胚初始愈伤为受体材料,在抗性愈伤分化阶段及时分选独立转化个体,有效缩短愈伤诱导及分化周期,显著提高了 Kasalath 的转化效率。本实验室以成熟胚为受体材料,针对 Kasalath、N22 等不同籼稻基因型,通过优化各培养阶段条件,也成功建立了成熟胚诱导的高效、稳定转化体系,转化率最高可达 44% (未发表数据)。

2.2 农杆菌菌株、载体和侵染方式的选择

农杆菌介导的外源基因转化是农杆菌菌株与植物细胞之间相互作用的结果,凡是能影响植物细胞应答能力、农杆菌侵染能力以及转化子再生能力的各种因素都会对其转化效果产生影响^[23]。目前用于水稻转化的农杆菌菌株主要是 LBA4404、EHA101 及它们的衍生菌株 EHA105、AGL1 等^[40]。Raineri 等^[41]采用 14 个农杆菌菌株转化 8 个水稻品种,在 LBA4404 转化 Fujisaka5 的组织中,检测到 *GUS* 活性,说明 LBA4404 适用于 Fujisaka5 品种的转化;进一步研究发现,菌株 AGL1 和 EHA105 按一定比例混合共转化和转化前菌体重悬能提高抗性愈伤率^[42]。易自力等^[43]和柳红等^[44]研究了 LBA4404、EHA105、AGL1 对多个籼稻品种转化效果后发现,EHA105 对受体的敏感性高于 LBA4404 和 AGL1。

载体系统有共整合载体系统和二元载体系统。二元载体系统可以实现载体与菌株的任意搭配,故普遍应用于水稻农杆菌转化,对于难转化的籼稻品种,载体与菌株的选择至关重要。超二元载体 pTOK233 与普通菌株 LBA4404 组合是一个有效的菌株载体系统^[5,45],说明超毒力菌株在某

些转化中表现优势,相关机理尚缺乏深入系统的研究。

农杆菌的附着,T-DNA 的转移和整合都在农杆菌与外植体共培养时期内完成,因此,掌握共培养技术和条件是转化成功的关键。共培养的效率受农杆菌菌液浓度、侵染方式、侵染时间、共培养温度和时间等因素影响。愈伤组织浸泡于菌液中震荡培养转化效果最好,可能是由于悬浮振荡能使细菌与愈伤组织细胞团充分接触,有利于侵染作用^[43]。适宜的侵染时间也是转化成功的关键,有研究表明侵染 20 min 的转化效果较好^[46]。共培养温度对转化成功与否也至关重要。*Vir* (virulence region) 基因活性的诱导对温度的要求是 20~30℃,*VirD*、*VirG* 的活化必须低于 28℃,早期报道共培养的适宜温度为 22℃,较低的温度虽然不易发生质粒的丢失并能控制细菌的过度生长,但植物细胞的生长也同时受到了抑制^[5]。

构建含有报告基因绿色荧光蛋白(GFP)或者红色荧光蛋白(RFP)的载体,通过荧光显微镜及时跟踪观察共培养时间等对瞬间表达率的影响,可方便快捷的优化籼稻侵染方式、时间等共培养条件^[47,48]。利用此技术,Saika 等^[39]和 Toki 等^[49]建议共培养温度为 25℃,采用此温度 3 d 后,可以观察到愈伤绿色荧光蛋白(*GFP*)的表达较强。本课题组在籼稻品种 N22 的突变体材料 Q4041,通过优化载体观察到 YFP 蛋白的表达率在 80% 以上,抗性愈伤分化率为 70% 左右;研究还发现,对于生长良好的愈伤,OD₆₀₀ 为 0.1~0.3 时进行转化,既能提高转化效率,又可减少转化株的假阳性(未发表数据)。

2.3 转化各阶段培养基和外源植物激素的影响

良好的胚性愈伤组织是籼稻成功转化的关键,目前,水稻组织培养中应用的基本培养基主要有:MS、N6、B5、CC、NB 等。不同籼稻品种的最佳培养条件相差较大,根据不同品种适当调整各种成分配比,适量加大有机成分如维生素和肌醇的含量可显著改善籼稻愈伤组织的质量^[50~53]。首先,大量成分是籼稻愈伤组织形成和生长的基础,林拥军等^[16]改良 MS 大量成分中硝态氮和铵态氮比例,优化出适合籼稻成熟胚继代、分化的培养基 L3、DL3。其次,微量成分的种类和含量是造成

愈伤组织诱导和生长效果差异的主要原因, Ge 等^[38]以 MS 大量元素为基础, 通过提高 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 等微量元素的使用剂量, 优化出适合籼稻抗白叶枯病近等基因系的愈伤组织继代培养基 S, 提高了胚性愈伤组织的再生能力; 籼稻培矮 64S 成熟胚在以 MS 大量元素、B5 微量、有机元素组合的培养基上愈伤组织诱导效果较好^[54]。

植物激素在植物组织培养过程中能调节愈伤组织的诱导及胚性结构的形成^[55,56]。诱导培养基在含 2,4-D 基础上, 适当添加 6-BA 可促使愈伤组织持续不断地形成胚状体, 改善愈伤质量, 并有利于后期愈伤组织的分化, 在细胞悬浮培养中细胞分裂素类物质能使长期培养的籼稻细胞保持胚性^[57]; 生长素 Picloram 和 Dicamba 应用于籼稻花药培养中, 与 2,4-D 配比使用愈伤诱导率高且质量好^[58]。不同品种成熟胚诱导高频胚性愈伤组织所需外源激素种类和浓度不同^[59]。外源激素的种类、浓度主要是改变组织培养力高低。

本课题组研究了 N6、MS、AAM、JW 基本培养基和生长素、脱落酸的 16 种组合对籼稻不同基因型成熟胚愈伤诱导的影响, 发现 MS 基本培养基比较适合 MH86、IR64、9311、Q25 等品种和材料的成熟胚愈伤的诱导, 而 N6 比较适合品种 N22 的诱导, 出愈率可以达到 80%, 且愈伤质地致密、颜色淡黄、鲜亮, 在 MH86、IR64 成熟胚愈伤诱导时, ABA 能有效抑制芽萌发, 2,4-D 能促进愈伤快速增殖, 但是 2,4-D 的效果强烈, 没有激素 Picloram 和 Dicamba 温和, 后两者在诱导后期能促使愈伤快速增殖(未发表数据)。

2.4 抗性愈伤组织的再生

抗性愈伤组织的再生是农杆菌介导籼稻转化中一大难点。随着选择和分化时间的延长, 愈伤组织的生理活性逐渐减弱, 出现大量的褐化、死亡细胞而难于分化, 所以控制或减少褐变将直接影响分化频率。解决的方案有: 在培养基中添加一定浓度的抗坏血酸, 继代培养基中添加一定比例的甘露醇, 及时把愈伤组织转移继代培养, 或者共培养后的洗菌水中加入适量山梨醇或甘露醇都有利于愈伤的生长和分化等^[60]; N6 大量元素和 MS 微量元素搭配使用有利于愈伤组织分化, 降低分化培养基中蔗糖含量, 加入适量山梨醇、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 和玉米素(Zeatin)均可明显提高籼稻愈伤组

织的分化率^[52]; 脯氨酸是一种有效的细胞渗透调节物质, 在分化培养基中添加脯氨酸, 也可以提高再生频率^[61]。延长共培养及对愈伤进行干燥处理, 能够成倍地提高再生频率^[62], 谭光轩等^[63]分析机理认为, 干燥处理能引起愈伤组织细胞中 mRNA 代谢的转变和过氧化物同工酶活性的升高, 使细胞内某些内源蛋白和激素水平发生调整, 从而影响愈伤组织胚状体的发育过程, 提高植株的分化率。

3 提高籼稻转化效率的对策

籼稻是我国最大的栽培稻类型, 栽培面积约占全国水稻面积的 74%^[64]。籼稻离体培养的愈伤组织诱导及植株再生比较困难, 且品种特异性明显, 严重地影响了籼稻转基因工作的开展。筛选适于遗传转化的籼稻受体品种, 建立高效、规模化的籼稻遗传转化平台, 同时针对目前基因功能研究及生产上普遍应用但较难转化的籼稻基因型, 探索建立稳定、高效的转化体系, 已成为当前籼稻转基因育种的首要任务。当前有必要开展以下几方面的研究工作, 争取突破籼稻遗传转化率普遍偏低这一技术瓶颈。

3.1 改良转基因受体品种, 创制一批适于高效遗传转化的籼稻受体基因型

转基因的难易程度在品种间差异很大, 同时在很大程度上受遗传控制, 并以加性效应为主^[65], 这使得通过常规杂交或基因工程手段改良难以转化水稻品种的转化效率, 人工创制适于遗传转化的籼稻基因型成为可能。特别是一些影响水稻分化效率的基因 *Os22A*^[32] 和 *NiR*^[33] 等的克隆, 为通过基因工程手段培育具有高组织培养能力和植株再生能力的籼稻品种奠定了基础。充分利用 *Os22A* 和 *NiR* 基因, 继续分离克隆新的与再生能力相关的基因, 通过转基因手段与常规杂交技术相结合, 培育出再生力强并适宜农杆菌转化的籼稻基因型, 以此作为规模化转化的受体品种, 可以满足规模化基因功能鉴定与育种价值评估需求。

3.2 建立良好的籼稻品种胚性细胞系

获得胚性愈伤组织是高效转化的前提, 建立良好的组织培养体系的重点是通过调整影响愈伤

组织质量的各项因素从而有效获得不同品种籼稻的胚性愈伤组织,调整的主要因素包括^[44]:①氮源:调整硝态氮、氨态氮和氨基酸三类氮源的比例可以调节愈伤组织的致密度、减少褐化;②植物激素:生长素能使细胞脱分化诱导愈伤组织的产生,细胞分裂素使愈伤组织发白、致密,有利于胚性细胞的产生,赤霉素能使细胞中的液泡变小、细胞质变浓。调整生长素和细胞分裂素的比例、适当添加赤霉素,能显著改善愈伤组织的质量;③糖:麦芽糖能降低愈伤组织褐化,但对愈伤组织的分化不利,蔗糖和麦芽糖适当交替使用可以减轻这种不利的影 响;④渗透压:多数籼稻愈伤组织松散,甘露醇或山梨醇可以调节细胞的渗透压,使其向胚性转变。

3.3 优化愈伤组织与农杆菌共培养条件,提高转化效率

愈伤组织与农杆菌共培养条件是决定外源基因能否有效进入愈伤组织的直接因素。利用半干燥法共培养,温度降低到 22℃,培养时间延长至 5 d 可显著提高胚性愈伤的侵染效率(未发表数据)。利用良好的植物瞬时表达系统跟踪检测农杆菌侵染效果、愈伤生长状态等,如以绿色荧光蛋白 *GFP* 基因或者红色荧光蛋白 *RFP* 基因作为报告基因,在转化后的各个环节用荧光显微镜随时检测感染效果和筛选效果,及时调整不同的标记基因及相应筛选剂浓度,找出最佳组合,可以有效提高转化率。

3.4 转化体的高效筛选及分化

采用适宜的筛选剂,通过改善筛选温度和光照条件,提高选择压,适当压缩筛选时间,及时遴选抗性独立转化个体,可以提高转化效率。通常生长快速的抗性愈伤获得阳性植株的频率高,同时还可有效防止愈伤褐化。此外,分化培养基的渗透压、分化前干燥愈伤及调整分化培养基里的激素配比,如山梨醇浓度、ABA 剂量、细胞激动素选择等可提高后期分化效率。

4 展望

经过多年的研究,农杆菌介导的水稻转化已经取得了很大的进展,但与国际转基因生物产业

快速发展和我国农业发展对转基因技术的需求相比,还面临诸多挑战。随着转基因产业化发展,对籼稻遗传转化提出了新的无选择标记的要求,如何建立一套高效的无选择标记的籼稻转基因技术体系是摆在籼稻转基因研究者面前的新课题。未来在农杆菌与水稻细胞间的作用机理深入研究和高转化效率的主栽品种基因型选择,新的农杆菌菌株和质粒载体筛选,培养基成分优化、更有效的侵染方式等领域的突破都会提高籼稻的遗传转化效率;随着籼稻遗传转化技术的进一步成熟,它对水稻基因的克隆和培育转基因籼稻品种等方面的贡献会越来越明显。

致谢:感谢本课题组程治军研究员和雷财林研究员对本文的精心修改!

参 考 文 献

- [1] Chen H, Lin Y J, Zhang Q F, et al. Review and prospect of transgenic rice research [J]. Chin. Sci. Bull., 2009, 54 (18):2699-2717.
- [2] 朱 祯. 转基因水稻研发进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(2):9-16.
- [3] Wanichananan P, Teerakathiti T, Roytrakul S, et al. A highly efficient method for *Agrobacterium* mediated transformation in elite rice varieties (*Oryza sativa* L. spp. *indica*) [J]. Afr. J. Biotechnol., 2010, 9(34):5488-5495.
- [4] Chan M T, Lee T M, Chang H H. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Physiol., 1992, 33(5):577-583.
- [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]. Plant J., 1994, 6:271-282.
- [6] Zhang J, Xu R J, Malcolm C E, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of elite *indica* and *japonica* rice cultivars [J]. Mol. Biotechnol., 1997, 8:223-231.
- [7] Mohanty A, Sarma N P, Tyagi A K. *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation of an elite *indica* rice variety Pusa Basmati1 and transmission of the transgenes to R2 progeny [J]. Plant Sci., 1999, 147:127-137.
- [8] Azhakanandam K, McCabe M S, Power J B, et al. T-DNA transfer, integration, expression and inheritance in rice: effects of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence [J]. J. Plant Physiol., 2000, 157:429-439.
- [9] Kumria R, Waie B, Rajam M V. Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite *indica* rice via *Agrobacterium* [J]. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2001, 67:

- 63-71.
- [10] Kumria R, Rajam M V. Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica* rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential [J]. *Plant Sci.*, 2002,162:769-777.
- [11] Hoque M E, Mansfield J W, Bennett M H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica* genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency [J]. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2005, 82:45-55.
- [12] Aldemita R R, Hodges T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties [J]. *Planta*, 1996,199:612-617.
- [13] Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, et al. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice [J]. *Plant Cell Rep.*, 1996, 15:727-730.
- [14] Khanna H K, Raina S K. Elite *indica* transgenic rice plants expressing modified Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*) [J]. *Transgenic Res.*, 2002,11:411-423.
- [15] Kumar K K, Maruthasalam S, Loganathan M, et al. An improved *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant elite *indica* rice cultivars [J]. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2005, 23:67-73.
- [16] Lin Y J, Zhang Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of *indica* rice [J]. *Plant Cell Rep.*, 2005,23:540-547.
- [17] Hiei Y, Komari T. Improved protocols for transformation of *indica* rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Tiss. s Organ Cult.*, 2006, 85:271-283.
- [18] Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed [J]. *Nat. Protoc.*, 2008, 3:824-834.
- [19] 肖君泽,邓建平. 花粉管通道转基因技术及在水稻分子育种中的应用 [J]. *中国农学通报*,2006,(2):87-90.
- [20] Lin J Z, Zhou B, Yang Y Z, et al. Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *indica* rice [J]. *Plant Cell Rep.*, 2009,28:1065-1074.
- [21] Supartana P, Shimizu T, Shioiri H, et al. Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, 100:391-397.
- [22] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1997, 35:205-218.
- [23] 高振宇,黄大年. 影响籼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.
- [24] 王萍,徐大勇,王昱. 粳籼稻两个亚种成熟胚组织培养与再生能力的比较研究 [J]. *种子*, 2007,26(10):66-67.
- [25] 陈红,秦瑞珍. 水稻花药培养过程中各种影响因子的研究进展 [J]. *中国农业科技导报*, 2007,9(3):52-56.
- [26] Glaszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1987, 74:21-30.
- [27] 肖媛,李落叶,徐孟亮,等. 根癌农杆菌介导籼稻 9311 遗传转化体系的建立 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*,2008, 31(3):77-82.
- [28] 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.
- [29] Taguchi-Shiobara F, Lin S Y, Tanno K. Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice *oryza sativa* L [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1997,(95): 828-833.
- [30] Kwon Y S, Kim K M, Eun M Y, et al. QTL mapping and associated marker selection for the efficacy of green plant regeneration in anther culture of rice [J]. *Plant Breed.*, 2002,121: 10-16.
- [31] Taguchi-Shiobara F, Yamamoto T, Yano M, et al. Mapping QTLs that control the performance of rice tissue culture and evaluation of derived near-isogenic lines [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2006,112:968-976.
- [32] Ozawa K, Kawahigashi H, Kayano T, et al. Enhancement of regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli by the integration of the gene involved in regeneration ability of the callus [J]. *Plant Sci.*, 2003, 165:395-402.
- [33] Nishimura A, Ashikari M, Lin S, et al. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005,12(33):11940-11944.
- [34] 宁约瑟,刘雄伦,戴良英,等. 根癌农杆菌介导水稻遗传转化研究进展及展望 [J]. *中国农学通报*,2007,23(3):47-52.
- [35] Vijayachandra K, Palanichelvam K, Veluthambi K. Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation [J]. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 29:125-133.
- [36] 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.
- [37] 王莉江,明小天,安成才,等. 籼稻明恢 63 成熟种子愈伤组织的诱导及转基因水稻的抗性检测 [J]. *生物工程学报*, 2002,18(3):323-326.
- [38] Ge X J, Chu Z H, Lin Y J, et al. A tissue culture system for different germplasma of *indica* rice [J]. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(5):392-402.
- [39] Saika H, Toki S. Mature seed-derived callus of the model *indica* rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Cell Rep.*, 2010,29: 1351-1364.
- [40] Cheng M, Lowe B A, Spencer M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2004, 40:31-45.

- [41] Raineri D M, Bottino P, Gondon M P, *et al.*. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Nat. Biotechnol.*, 1990, 8:33-38.
- [42] 李双成,王世全,尹福强,等.提高农杆菌介导转化水稻效率的因素[J].*中国水稻科学*, 2005, 19(3):231-237.
- [43] 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.
- [44] 柳红.籼稻高效遗传转化体系的建立[D].福州:福建农林大学,硕士学位论文,2009.
- [45] Dong J J, Teng W M, Wallace G, *et al.*. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Japanica* rice [J]. *Mol. Breed.*, 1996, 2:267-276.
- [46] 王兰,田华.根癌农杆菌介导的水稻遗传转化研究进展[J].*安徽农业科学*, 2009, 37(30):14594-14596.
- [47] 尹涛,秦巧平,张上隆,等.利用 GFP/RFP 双荧光指示载体鉴定特异性启动子功能[J].*生物工程学报*, 2008, 24(12):2106-2110.
- [48] 史俊.水稻强分蘖基因 MT1 启动子的克隆及与 GUS、GFP 融合基因的构建[J].*安徽农业科学*, 2010, 38(21):11061-11062.
- [49] Toki S, Hara N, Ono K, *et al.*. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice [J]. *Plant J.*, 2006, 47:969-976.
- [50] 马炳田,李平,周开达,等.杂交籼稻亲本愈伤组织培养力的研究[J].*四川农业大学学报*, 2002, 20(3):201-204.
- [51] 王玉珍,罗景兰,徐进,等.农杆菌介导的水稻遗传转化与植株再生[J].*华北农学报*, 2005, 20(1):8-11.
- [52] 刘元凤,刘颜卓,王金花,等.根癌农杆菌介导籼稻遗传转化影响因素研究[J].*分子植物育种*, 2005, 3(5):737-743.
- [53] 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.
- [54] 周凤,于卉,葛占宇,等.微量元素浓度对 3 个籼稻品种愈伤组织褐化和分化的影响[J].*农业生物技术学报*, 2010, 18(4):702-706.
- [55] 李卫东,葛会波,周春江,等.草莓花药愈伤组织类型与状态调控研究[J].*河北农业大学学报*, 2004, 27(2):59-63.
- [56] 付凤玲,冯质雷,渠柏艳,等.玉米未成熟胚性愈伤组织诱导率与内源激素含量的关系[J].*核农学报*, 2006, 20(1):10-14.
- [57] Tang K X, Zhao E P, Hu Q A, *et al.*. A simple and efficient procedure to improve plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell-suspension cultures of *indica* rice [J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2000, 36(5):362-365.
- [58] Silva T D. *Indica* rice anther culture; can the impasse be surpassed [J]? *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2010, 100:1-11.
- [59] 阎丽娜,李霞,吴丹.不同类型水稻材料成熟胚组织培养力的比较[J].*中国农业科学*, 2010, 43(6):1127-1135.
- [60] Reddy K K. Regeneration of plants from long-term cultures of *Oryza sativa* L [J]. *Plant Cell Rep.*, 1986, 5(5):391-393.
- [61] 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[J].*遗传学报*, 2001, 28(10):933-938.
- [62] 王力,张云孙,陈屹,等.影响水稻愈上组织植株再生频率的因素研究[J].*云南大学学报*, 1999, 21(3):113-115.
- [63] 谭光轩,舒理葱,袁文静,等.干燥处理对野生稻愈伤组织绿苗分化率和某些生化指标的影响[J].*武汉大学学报*, 1997, 43(4):485-489.
- [64] 万建民.中国水稻遗传育种与品种系谱(1986-2005) [M].北京:中国农业出版社,2010.
- [65] 陈璋,朱秀英,卢勤.水稻种胚离体培养的基因型效应[J].*福建农学院学报*, 1991, 20(1):8-11.