

農桿菌媒介

秈稻轉殖平台之建立

農試所生技組 王怡雯 陳涵葳 游舜期 王昭月 曾馨儀 林大鈞

一、前言

水稻基因體解序工作於1998年展開，結合日本、美國、中國大陸、台灣與法國等10個國家的資源進行合作，解序初稿已在2002年12月發表，並於2004年宣告完成，涵蓋97%以上基因組序列解讀，精準度高達99.99%，對於單子葉基因表現調控提供珍貴訊息。為了能夠有效利用水稻基因體資訊，並達到抗病蟲、節水生長、耐逆境與高產育種的最終目標，建立水稻基因功能驗證轉殖平台便顯得相當重要。農桿菌轉殖的優點包括低成本、高效率、低拷貝數、適合大片段基因轉移，且轉植株具有外源基因表現穩定等特性。自1994年Hiei等學者成功取得梗稻農桿菌轉植株後(Hiei *et al.* 1994)，轉殖率可達30~50%，但秈稻僅有2成的品種可以透過農桿菌法進行轉殖，且轉殖效率遠低於梗稻品種，顯示梗稻與秈稻間存在相當多的品種差異性。本文將簡

單介紹秈稻轉殖效率低的原因，以及目前秈稻轉殖系統發展的概況。

二、秈稻轉殖障礙之成因

影響秈稻品種或品系轉殖效率的原因除了品種差異外，還包括了下列因素：(1) 感染組織細胞種類與株齡；(2) 轉殖所使用的農桿菌菌種；(3) 轉殖之外源基因、表現載體之構築等；(4) 篩選的抗生素種類、濃度；以及 (5) 轉殖後水稻培植體再生條件等。Hiei及Komari兩位學者改以秈稻新鮮未成熟的胚作為培植體起始材料，並改進胚的切片方式，轉殖效率可提高至6~8倍，顯示植物材料組織選擇對轉殖效率亦有顯著影響 (Hiei & Komari. 2006)。比較EHA105與LABA4404兩種常見的農桿菌菌種對秈稻品種的轉殖效率，結果顯示LBA4404具有較佳的轉殖成功率，可見植物材料與轉殖菌種間具的交互作用對轉殖效率影響大 (Pipatpanukul *et al.* 2004)。

農桿菌對不同種(species)或不同品種(cultivars)之培植體感染能力差異相當明顯，培植體經農桿菌感染後後產生的防禦反應，常會表現抑制生長的代謝產

作者：王怡雯聘用助理研究員
連絡電話：04-23317356

物，導致培植體褐化和壞死現象，2012年Tei等學者選擇秈稻系統的珍汕Zhenshan 97 (ZS)與梗稻系統的日本晴Nipponbare (Nip) 兩品種為材料，以轉錄體學的方式分析兩者轉殖效率差異的成因(Tei *et al.* 2012)。將ZS與Nip種子胚盤所誘導的癒傷組織以農桿菌法進行轉殖，共培養後3天ZS與Nip的轉殖效率分別為40.8%與85.2%，而20天後轉殖率則分別降為3.2%與53.5%，顯示秈稻品種之農桿菌轉殖效率，不論是暫時性與穩定性表現上均較梗稻差；以微陣列 (microarray) 分析農桿菌轉殖後0、1、6、12、24小時之水稻樣品全基因組表現群組 (genome-wide expression profiling)，並將結果以TIGR Rice Genome Annotation project、Gene Ontology (GO) 與Biological process (BP) 所公布的基因解序資料進行基因功能註解與分類，可知在早期的感染階段 (1~6小時)，ZS品種中與氧化逆境、創傷、ABA刺激、細胞訊息傳遞、碳水化合物、多醣、幾丁質分解等相關基因表現量提升，而荷爾蒙、生長素、DNA受損後修復等相關基因表現則下降，推測秈稻對

農桿菌感染後啟動較強的防禦反應，使農桿菌無法順利進入細胞核中，進而影響秈稻轉殖效率。

三、秈稻轉殖系統之改進

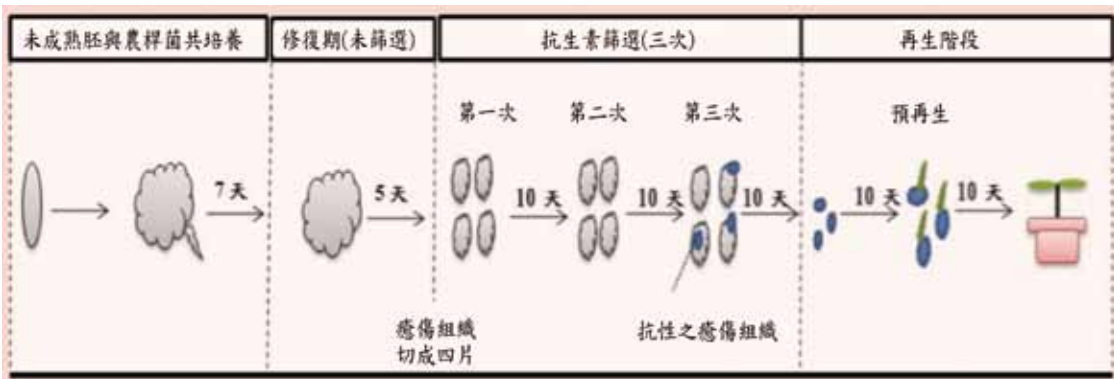
本實驗室以TN1及IR64作為秈稻轉殖的模式品種，選擇適合的培植體、菌種，配合玉米Ubi-1啟動子驅動綠色螢光蛋白(ZsGFP)的表現載體，進行秈稻轉殖效率試驗，螢光蛋白表現可幫助培植體的早期篩選，縮短秈稻轉殖效率試驗的進程。改進後的秈稻轉殖流程簡述如下(圖一)：

Step 1：材料前處理

選取未成熟的乳熟期水稻種子，約是水稻授粉後2週之穀粒，將種子外殼去除後並放置於50 ml 離心管，加入75 %酒精後輕微搖動消毒1分鐘，再以1 %漂白水消毒5分鐘，隨後用無菌水清洗5次。

Step 2：農桿菌轉殖與共培養

將消毒完的種子放置於無菌濾紙上，以鑷子擠壓將胚擠出，取出的胚以胚盤朝上的方向放置於誘導培養基，之後加入活化的農桿菌菌液 $5 \mu\text{l}$ (O.D=0.3)，於 25°C 下黑暗處理共培養7



圖一、秈稻轉殖平台流程示意圖。

天。共培養結束後移除未成熟胚之芽體，並將殘存的農桿菌菌液清除，再將轉殖後的胚以胚盤朝上的方向放置於恢復培養基，於30°C全光照靜置5天。

Step 3：癒傷組織誘導、篩選

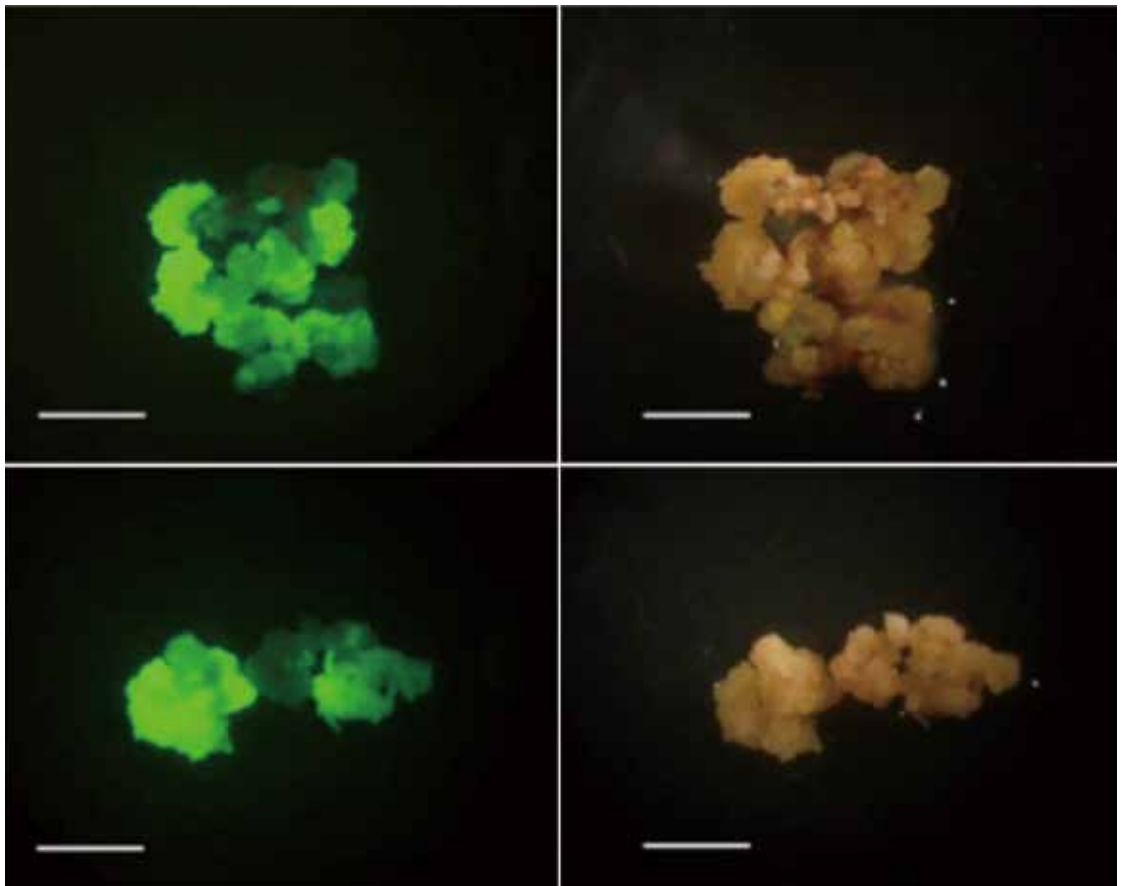
待培植體修復後將轉殖的胚切成4塊，胚盤朝上放置於篩選培養基，於30°C全光照處理10天，經過二次的篩選後，可在螢光顯微鏡下確認癒傷組織是否有螢光基因表現(圖二)，將確認螢光蛋白表現的癒傷組織移至預再生(pre-regeneration)培養基，於30°C全光照10天，其餘癒傷組織則繼續於篩選培養基繼代。

Step 4：癒傷組織再生與擬轉殖株確認

癒傷組織在預再生培養基中可分化產生綠色點狀，將具有綠點的癒傷組織移至再生分化培養基培養，便可取得擬轉殖株(圖三)。以無菌土栽種於生長箱，進行馴化，待其生長健壯後，便移至溫室待其抽穗結實。同時，進行分子檢測確認外源基因是否成功導入。

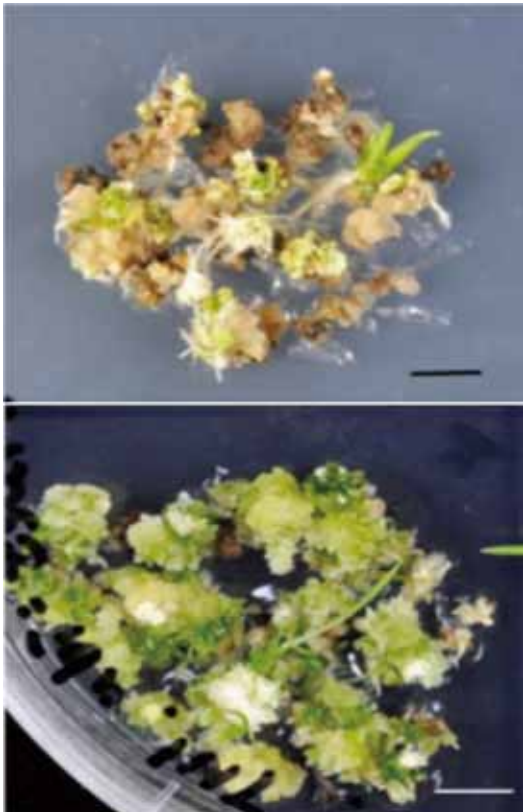
四、未來展望

探討水稻基因功能研究必須建立高效率且適合各品種通用的轉殖技術平台，然而目前的轉殖系統以梗稻較純熟，同時轉殖效率也較高，但是在秈稻的轉



圖二、具抗性之癒傷組織螢光基因表現情形。左：螢光光源；右：普通光源。Bar=0.5cm。

殖系統的報導卻是較少且相對困難，雖有成功的例子，但是轉殖率低，僅限於特定的品種，本方法能從單一未成熟胚獲得大量獨立的轉植株系，簡化試驗工作流程，精簡人力支出，是一個有效率的轉殖平台，未來還可廣泛應用於組織培養再生率低及基因轉殖困難的品種，有助於探討秈稻基因功能功能性驗證。此外，隨著基因組編輯 (genome editing) 技術的發展，可利用 meganuclease、ZFN (Zinc-finger nuclease)、TALEN (transcription activator-like effector nuclease) 與 CRISPR (clustered, regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9) 等方法，對目標基因



圖三、癒傷組織再生分化成擬轉植株。

的DNA片段進行突變、置換、插入等編輯，而將目標基因剔除 (gene knockout) 及剔除 (gene knock-in)，開拓了基因工程新視野，配合改良後的水稻轉殖技術，進行重要性狀基因在秈、梗遺傳背景下的功能驗證，可作為後續分子育種的重要基礎。

伍、參考文獻

- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6 (2):271-282.
- Hiei, Y., S. Ohta, and T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *plant cell, Tissue and Organ Culture* 85:271-283.
- Tie, W., F. Zhou, L. Wang, W. Xie, H. Chen, X. Li, and Y. Lin. 2012. Reasons for lower transformation efficiency in indica rice using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: lessons from transformation assays and genome-wide expression profiling. *Plant Mol Biol* 78 (1-2):1-18.
- Pipatpanukul, T., Bunnag, S., Theerakulpisut, P. and Kosittrakul, M. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Sci. Technol* 26 (1) : 1-13