中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 50(3): 1～11 (2001)

基因鎗轉殖台農67號水稻影響因子研究[1]

夏奇鈱　顏信沐　曾東海　卓緯玄　王強生[2]

摘要：本研究以本省最普遍栽培之水稻品種－台農67號之成熟種子爲材料，利用基因鎗(Biolistic PDS1000/He device, Bio-Rad) 進行基因轉殖。將成熟種子去殼後培養於添加2, 4-D之培養基中誘導胚性癒合組織增生，並以此材料測試影響基因鎗轉殖效率之各項因子，轉殖效率評估以GUS基因之暫時表現率爲依據。評估之因子包括：培植體預培養天數、微載體種類及用量、高滲透壓處理及轉殖質體對轉殖之影響；基因鎗測試之條件有：微載體至射擊目標之飛行距離（6、9 cm），大載片至擋片之距離（4、8及12 mm）。初步結果顯示，以預培養2～7日之胚性癒合組織逐日測試轉殖率，以預培養7日之培植體表現最佳；培植體於轉殖前4小時至轉殖後24小時以高滲透壓培養基處理，有助於轉殖效率之提高；比較金、鎢粒子對轉殖率在轉殖後48 h並無不同，但轉殖後120 h取樣，則金粒子組有較高之藍點數；鎢粒子用量可減少至1/3標準用量對轉殖率並無影響；利用基因鎗在使用1,100 psi裂碟片、大載片至擋片之距離爲4 mm、微載體至射擊目標之飛行距離6或9 cm之設定，GUS基因表現之平均藍點數均可達15～20個／培植體。

關鍵詞：水稻、基因鎗、轉殖。

前　言

隨著生物技術的快速發展，轉基因作物之育成已成爲二十一世紀作物品種改良的新趨勢，也是未來解決糧食缺乏問題希望之所寄。水稻是台灣最重要之農作物，亦是全球多數人口之主要糧食，水稻轉殖研究的重要性不言可喻[4, 8, 19, 23]。本省水稻優良品種眾多但常用於轉殖研究之品種如台北309，主要原因即其具高再生率[3, 5]，但如考慮各品種在產業上相對之應用價值，具有較多優良農藝性狀之台農67號，值得我們投入更多的研究。

農桿菌轉殖法是植物基因轉殖常用之方法[14]，然而對於某些較難轉殖之單子葉植物，一般認爲必須針對不同作物，在轉殖質體 (plasmid) 構築及共培養 (co-culture) 方式上予以改進，方能提高農桿菌之轉殖效率[5, 23]。基因鎗轉殖法 (particle bombardment) 是另一個普遍採用於植物之基因轉殖法，因不需考慮寄主 (host) 與載體細菌 (vector) 之交感作用，因此常應用於農桿菌不易轉殖之單子葉植物[7]，尤其基因鎗在操作多個基因轉移上非常簡便[11]。此外利用基因片段與報導基因之結合，可快速測試基因結構與表現，亦爲基因鎗轉殖之優點[13]。影響基因鎗轉殖之因子可以分爲：受體植物本身之生理狀態，如培植體的再生能力；基因鎗射擊設定之各種參數組合；轉殖過程中如何減少粒子撞擊所引起之傷害；以及轉殖質體之構築以利外源基因在植物體內表現等[4, 19, 22]。

因爲水稻在糧食產業及分子生物研究上之重要性，水稻基因轉殖多年來不但轉殖方法日趨簡單，

1. 行政院農委會農業試驗所研究報告第2074號。

2. 本所農藝系副研究員、助理、助理研究員、助理及副研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

轉殖效率更不斷提昇[6, 8]，然而不可諱言其應用之結果常因材料、環境之不同而有差異，針對諸多影響因子仍需個別加以調整，方能達到較高之轉殖效率。本篇研究即以本省最重要之栽培品種台農67號爲材料，藉由探討影響基因鎗轉殖台農67號水稻之個別因子，進而建立利用基因鎗轉殖台農67號水稻模式之初步結果。期望利用台農67號所建立之高效率水稻基因轉殖系統，未來對於生產各種抗病、抗蟲、及特殊成分基因導入之高附加價值水稻將更爲具體可行。

材料與方法

台農67號之成熟種子去殼後以2.6%次氯酸納溶液（稀釋2倍之Clorox）消毒30分鐘，再以無菌水清洗3次後培養於癒合組織誘導培養基，經數日培養後取胚盤處長出之胚性癒合組織做爲轉殖材料。基本培養基爲N6鹽類[9]並於每公升中添加1.15 g哺氨酸，300 mg水解酪蛋白，500 mg穀胺醯酸，300 mg酸性水解酪蛋白 (casamino acid)，3 g水晶洋菜，30 g蔗糖及1 mg 2, 4-D。轉殖儀器爲粒子撞擊基因傳送系統PDS1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad)，以下簡稱爲基因鎗。試驗如未特別聲明，係使用0.6 μm金粒子做爲微載體 (microcarrier)，基因鎗射擊參數爲：氦氣壓力以1,100 psi裂碟片 (rupture disc) 控制，裂碟片保持蓋與微載體送出組的間隙距離1/4英吋，大載片 (macrocarrier) 至擋片（stop screen）之距離爲4 mm（大載片飛行距離），射擊距離爲9 cm（微載體飛行距離），並將眞空度抽至27 mmHg。每一個培養皿以同樣之設定射擊二次，GUS基因組織化學染色係依照Jefferson (1987)[16]方法進行，並以觀察藍點表現做爲評估下列試驗轉殖效率之依據。

一、培植體預培養天數對轉殖之影響

台農67號之成熟種子於上述胚性癒合組織誘導培養基中[1]，經2～7日之暗培養後取出進行基因鎗射擊。

二、微載體種類與用量對轉殖之影響

比較金粒子與鎢粒子兩種微載體對轉殖效率之影響，金粒子直徑爲0.6 μm，鎢粒子爲0.73 μm(M-10)，微載體之準備依照基因鎗使用手冊之操作流程，轉殖條件除微載體飛行距離爲6 cm外，皆與上述基因鎗之基本設定相同，並於鎗擊後48小時及120小時，進行培植體GUS基因之組織化學染色。

以鎢粒子測試微載體用量對轉殖之影響，建議之標準使用量爲3mg/reaction，試驗比較1/2、1/3、1/6之標準微載體用量對轉殖之影響。

三、基因鎗設定參數對轉殖之影響

基因鎗測試之條件有：微載體至射擊目標之飛行距離分別爲6及9 cm，大載片至擋片之距離有4、8及12 mm則藉由間隔環數調整。

四、高滲透壓處理對轉殖之影響

高滲透壓 (0.46M) 培養基爲原胚性癒傷組織誘導培養基將其中蔗糖0.09M (30g/l) 降爲0.06M (20 g/l)，並添加各0.2M (36.4 g/l) 之甘露醇 (mannitol) 與山梨醇 (sorbitol)，培植體於轉殖前4小時移入高滲透壓培養基，並於轉殖後24小時移回原培養基，對照組則利用原胚性癒傷組織誘導培養基。

五、轉殖質體對轉殖之影響

供轉殖用之二質體係pZO1052 (7.65 kb)及pBI121 (13.0 kb)，二質體之報導基因及篩選基因皆以*Nos*爲終結子，其中pZO1052具有*Gus*報導基因及*Hpt*篩選基因，二基因皆由CaMV35S之啓動子所引導，但pZO1052之*Gus*報導基因及*Hpt*篩選基因前均插入有玉米ADH基因之內含子 (intron)（圖1A）；pBI121之*Gus*報導基因由CaMV35S啓動子引導，篩選基因*Kan*則由*NOS*啓動子引導（圖1B）；質體DNA皆以Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Germany) 純化，並以光電比色計將DNA濃度定量至1 μg/μl。

A. pBI121 質體



B. pZO1052 質體

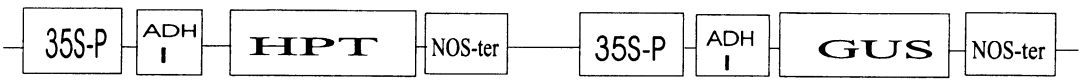


圖1. 轉殖質體構築圖 A. pBI121 及 B. pZO1052。

Fig. 1. The constuction of A. pBI121, and B. pZO1052.
P: promoter; 35S-P: CaMV35S promoter; ADH I: maize ADH6 intron

六、統計分析

試驗所得數據利用 SAS 程式計算分析其結果，經變方分析後若處理效果顯著者，則利用最小顯著性測驗 (least significant difference, LSD) 在 5% 顯著差異水準下進行平均值顯著性測驗。

結　果

一、培植體預培養天數對轉殖之影響

去殼之成熟種子於胚性癒合組織誘導培養基中，經 2～7 天培養後進行基因鎗轉殖，並於轉殖後 48 小時取培植體進行 *GUS* 基因組織化學染色，試驗結果如表 1，不同天數預培養對轉殖影響顯著（1% 顯著水準），經不同天數預培養之培植體藍點反應百分比與 20 個培植體所得之總藍點數呈現相同之趨勢，即藍點數隨著 2-4 日預培養逐漸增加，第 4 日之藍點較前兩日（2～3 日）爲多且明顯（圖 2A），第 5～6 日芽鞘生長明顯，已可見胚盤上癒合組織之生長，但藍點數較前減少，至第 7 日藍點數顯著增加（圖 2B），其中 95% 培植體皆有藍點反應，20 個培植體之藍點總數爲 186（表 1）。

表 1. 培植體預培養天數對台農 67 號水稻轉殖率之影響

Table 1. The effects of preculture of rice cultivar 'Tainung 67' explant on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Preculture day	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
2	20	25	17	0.9 [b]
3	20	40	23	1.2 [b]
4	20	70	58	2.9 [b]
5	20	40	21	1.1 [b]
6	20	20	12	0.6 [b]
7	20	95	186	9.3 [a]

* The different letters indicate a significant difference at the 1 % level by LSD test.

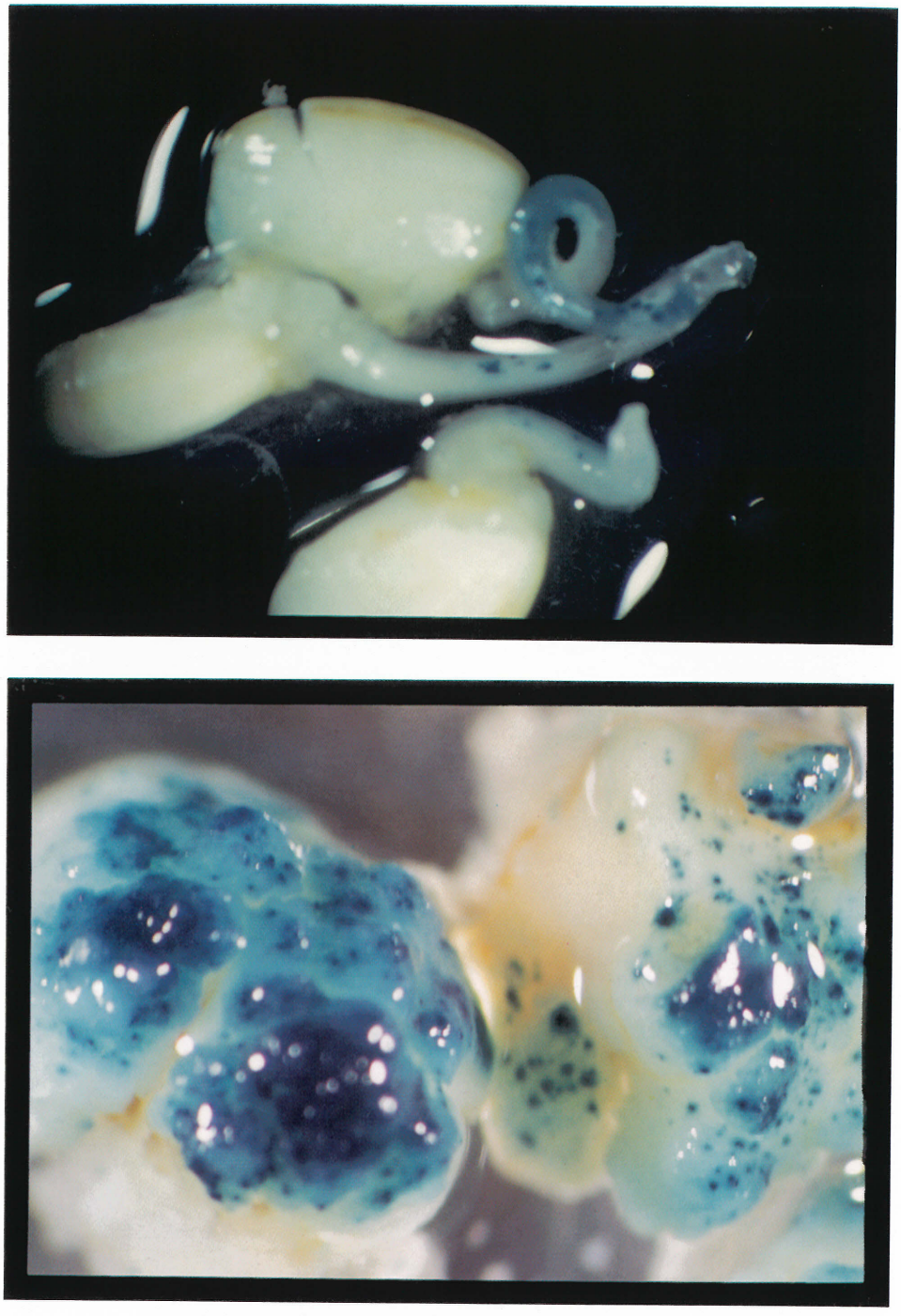


圖2. 不同預培養天數水稻培植體基因鎗轉殖後GUS基因之表現，A. 4日預培養，B. 7日預培養。

Fig. 2. Transient expression of GUS gene after bombardment of rice explants with various preculture days, A.4-day preculture, B. 7-day preculture.

二、微載體種類與用量對轉殖之影響

比較金或鎢粒子做爲DNA攜帶體對轉殖效率之影響，並以GUS染色檢測於鎗擊48小時及120小時後進行取樣，結果如表2。在48小時取樣組，使用金或鎢粒子總藍點數分別爲393及206，平均藍點數分別爲6.6及3.4，差異並不顯著。在120小時取樣組，使用金或鎢粒子總藍點數分別爲544及89，平均藍點數分別爲9.1及1.5，金粒子處理顯著高於鎢粒子。

以鎢粒子測試減少微載體用量之影響，結果顯示如表3，標準用量減半 (1.5mg/reaction)、1/3 (1 mg/reaction) 用量或1/6用量 (0.5 mg/reaction) 間差異並不顯著，其中以1/3用量最佳，30個培植體之藍點總數可達521，平均藍點數爲17.4；1/6用量藍點數亦可達364，平均藍點數12.1，而以1/2用量之總藍點數19爲最低，亦即較高之微載體用量在轉殖上並非必要。

表2. 基因槍轉殖法中微載體金、鎢粒子對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 2. The effects of microcarrier of gold or tungsten particles for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Microcarrier	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
		48 h post-bombardment		
Gold	60	55.0	393	6.6 [a]
Tungsten	60	38.3	206	3.4 [a]
		120 h post-bombardment		
Gold	60	38.3	544	9.1 [a]
Tungsten	60	23.3	89	1.5 [b]

* Means were compared separately for each sampling time. The different letters indicate a significant difference at the 5% level by LSD test.

表3. 基因槍轉殖法中微載體鎢粒子用量對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 3. The effects of amount of tungsten particles used for DNA preparation for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

tungsten mg/reaction	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
1.5	30	20.0	19	0.63[b]
1.0	30	50.0	521	17.4[a]
0.5	30	53.3	364	12.1[ab]

* The different letters indicate a significant difference at the 5% level by LSD test.

三、基因鎗設定參數對轉殖之影響

測試金、鎢微載體至射擊目標之飛行距離6及9 cm對轉殖之影響，GUS染色取樣時間分別爲射擊後48及120小時，結果各如表4及表5。金粒子微載體測試之結果如表4，48小時取樣組6及9 cm處理培植體總藍點數及平均藍點數均無差異；120小時取樣組，6及9 cm處理培植體總藍點數分別爲544及204，但平均藍點數在統計上差異不顯著（表4）。以鎢粒子微載體測試之結果與金粒子之結果相同，顯示在48及120小時取樣，6及9 cm處理效果同樣皆不顯著（表5）。其中以金粒子爲微載體時，藍點數並非絕對隨著時間下降，金粒子微載體6 cm飛行距離在120小時取樣組之藍點數即較48小時取樣組爲高。

將基因鎗微載體至射擊目標之飛行距離固定爲6 cm，比較大載片至擋片之距離（4、8及12 mm）對轉殖之影響，結果如表6，處理間之差異顯著（5%顯著水準），以最小間隔環處理之藍點數最高

表4. 微載體金粒子至標的物間射擊距離對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 4. The effects of the flight distance of gold microcarriers for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Microcarrier flight distance (cm)	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
		48 h post-bombardment		
6	60	55.0	393	6.6 [a]
9	60	58.3	271	4.5 [a]
		120 h post-bombardment		
6	60	38.3	544	9.1 [a]
9	60	33.3	204	3.4 [a]

* Means were compared separately for each sampling time. The different letters indicate a significant difference at the 5 % level by LSD test.

表5. 微載體鎢粒子至標的物間射擊距離對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 5. The effects of the flight distance of tungsten microcarriers for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Microcarrier flight distance (cm)	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
		48 h post-bombardment		
6	60	38.3	206	3.4 [a]
9	60	33.3	81	1.4 [a]
		120 h post-bombardment		
6	60	23.3	89	1.5 [a]
9	60	21.7	53	0.9 [a]

* Means were compared separately for each sampling time. The different letters indicate a significantly difference at the 5 % level by LSD test.

表6. 基因槍大載片至擋片間距離對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 6. The effects of the flight distance of macrocarriers for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Microcarrier flight distance (mm)	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
4	40	47.5	100	2.5[a]
8	40	37.5	45	1.1[b]
12	40	20.0	23	0.6[b]

* The different letters indicate a significant difference at the 5 % level by LSD test.

(100)，8及12 mm間隔環處理藍點數分別爲45及23，二者差異不顯著。

四、高滲透壓處理對轉殖之影響

高滲透壓培養基處理之結果如表7，處理之效果顯著 (5%) 高於對照組。無論以胚盤或種子爲培植體，高滲透壓培養基處理（平均藍點數11.67，5.6）皆高於未處理之對照組（平均藍點數0.1，4.1），其中高滲透壓處理對胚盤之影響尤爲顯著，高滲壓處理與對照組之藍點數分別爲11.7及0.1。

五、轉殖質體對轉殖之影響

在相同之轉殖條件下，二種轉殖質體之基因表現差異大（1%顯著水準），結果如表8，其中以pZO1052表現較佳，平均藍點數爲4.63，常用之轉殖質體pBI121轉殖效率較差平均藍點數僅爲0.23。

表7. 高滲透壓處理對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 7. The effects of high osmotic treatments for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Osmotic treatment	0.09 M corbohydrates		0.46 M carbohydrates	
Explant	Scutellum	Whole seed	Scutellum	Whole seed
Total explants	15	15	15	15
%GUS expression	6.7	60	86.7	80
Total blue spots	1	61	175	84
Mean blue spots/explant*	0.1 [b]	4.1 [b]	11.7 [a]	5.6 [ab]

* The different letters indicate a significant difference at the 1 % level by LSD test.

表8. 轉殖質體對台農67號水稻轉殖率之影響

Table 8. The effects of plasmids for transformation of rice cultivar 'Tainung 67' on particle bombardment, as determined by transient expression of GUS gene

Plasmid	Total explants	%GUS expression	Total blue spots	Mean blue spots/explant*
pBI121	30	10.0	72	0.23 [b]
pZO1052	49	63.3	27	4.63 [a]

* The different letters indicate a significant difference at the 1 % level by LSD test.

討　論

本研究採用本省最普遍栽培之台農67號成熟種子爲材料，主要著眼於將來研究成果之累積，有其廣大之應用性。報告中藉由GUS基因之暫時表現，可有效的評估培植體、基因鎗參數以及不同轉殖質體對外源基因表現之影響，藉以迅速改進影響基因鎗轉殖之各項因子，加速轉殖系統之建立與轉基因水稻之育成。

對於秈稻 (indica rice) 而言，許多轉殖研究常以未成熟胚爲材料[12]，原因爲未成熟胚具有較高之再生能力，但未成熟胚受到季節之限制及長期維持成本較高等缺點，對於大量轉殖之進行並不適用；本省栽培主要以再生培養較無困難之粳稻 (japonica rice) 爲主，因此可利用成熟胚爲轉殖材料，培植體選擇上較無限制[1]。目前國內從事水稻轉殖研究者日眾，基因鎗與農桿菌轉殖法是最常用之兩種轉殖方法，但有關影響基因鎗轉殖之各項基本因子，可資參考之報告並不多[2]，雖然理論上沒有任何一個操作流程適用於所有品種，但各項影響因子基本資料一旦建立，將可提供其他相關研究進一步改進之參考，尤其針對特定品種轉殖率之改進，應可快速建立。

預培養處理因可增加細胞分裂活性，故常被用來提高轉殖率[10]，以成熟水稻種子爲培植體而言，太早進行轉殖有可能胚之生長尚未啓動，太晚則胚性癒合組織再生力逐漸降低[1]，因此適當的預培養時間可以提高轉殖之效率。除了考慮培植體之生理狀態外，以水稻而言，未經預培養之成熟種子，胚所佔體積甚小，胚乳則佔有種子體積之大部分，因基因鎗原理爲逢機散射，以種子各部分體積比例而言，具有再生力之胚被微載體擊中之機率相對較低。在本試驗中觀察種子在培養第2日即可見隆起之胚及芽鞘，部分種子更可見芽鞘伸出，至第3日時大部分芽鞘皆已伸長。生長初期（第2～3日）以芽鞘之生長較爲明顯，因此在預培養之第3～4日，藍點主要出現在芽鞘上（圖1A），第5～6日後芽鞘漸細長而胚盤之癒合組織開始膨大，此時藍點主要集中於芽鞘與胚盤癒合組織交界處。在預培養初期（2～4日）可以見到藍點表現逐日增加，推測主要原因在於啓動胚的生長與活性，但隨著預培養天數增加，此時胚芽套及胚根之伸長與胚性癒合組織之生長有競爭之趨勢，且胚芽套、胚根及胚乳佔據培

植體之大部分，這或可解釋在經5～6日預培養藍點數下降之原因（表1）。綜合試驗數據及生長模式觀察，推論在預培養之第1～3日主要在於啓動胚的生長，在第4日後芽鞘與胚盤癒合組織之生長有明顯之競爭趨勢，因轉殖主要利用由胚盤長出之胚性癒合組織，因此建議將芽鞘於第3或4日移除，以增加胚性癒合組織後續生長，芽鞘移除後可以見到癒合組織生長有明顯增加之趨勢；以射擊面積而言，芽鞘移除後亦增加胚性癒合組織被射中之機率。本試驗中預培養7日處理之轉殖率顯著高於其他組，可以印證第6日後應該是較適當之轉殖時期，（表1、圖1B）。

許多的研究指出粒子的種類及大小對轉殖率有明顯之影響[19]，鎢粒子與金粒子相較，前者較易對細胞產生毒害之不良影響，但鎢粒子優點爲價格便宜，且在微載體製備時沒有金粒子易於集結之缺點[20]，因此鎢粒子與金粒子比較，如果表現相同或更好時，則毋需使用昂貴之金粒子。本試驗在轉殖後48 h檢測結果顯示使用金粒子或鎢粒子對轉殖差異並不顯著，證實鎢粒子應可使用於水稻之基因轉殖，至少在測試基因暫時表現率方面無不良影響，惟轉殖後120小時之取樣結果顯示，金粒子仍保持甚至有更高之藍點表現，這點是否表示金粒子之轉殖較爲穩定或鎢粒子不利於細胞之後續生長，因而影響其藍點表現率則仍有待證實。以水稻爲例，Jain等人[15]之研究指出，以直徑1.0 mm之金及鎢粒子比較，金粒子之GUS藍點表現爲鎢粒子之2.5～5.4倍。然而亦有報告指出使用0.73 mm鎢粒子於水稻轉殖，每5個培植體即可得一轉殖水稻之高轉殖率[17]，從這些結果顯示，各品種水稻對金或鎢粒子之接受性或有不同，因此其他轉殖條件之配合都可能是造成最後差異的原因。

在Casas等人之報告建議將鎢粒子比率從60 mg/ml（標準全量）降至15 mg/ml（1/4用量），有助於減少鎢粒子對細胞之毒性[4]。其實微載體之減量與DNA用量增加對轉殖促進常有相同之效果，原因是DNA/微載體之比率遠比這兩個因子單獨存在對微載體包覆DNA之影響重要[21]。本試驗以價格較低之鎢粒子測試減量之影響，結果顯示鎢粒子微載體用量減少（1/2，1/3，及1/4用量）對轉殖並無不良影響，此一結果對於價格較昂之金粒子尤爲重要，但推測微載體應有一最佳使用量（DNA/微載體之適當比率），如試驗中使用1/3微載體標準用量，可能與DNA之比率較適當，因此有較高之藍點表現（17.4）。

在基因鎗設定中三個可調距離因子分別爲 1. 裂碟片保持蓋與微載體送出組的間隙距離（1/8、2/8及3/8英吋），2. 大載片至擋片之距離 (4、8及12 mm)，可經由調整間隔環數目（每個4 mm厚）達成，3. 微載體至射擊目標之飛行距離 (6、9、12 cm)，其中射擊距離被認爲是較重要之條件，以射擊目標之飛行距離而言，理論上較短之距離 (6 cm) 承受較強之衝擊力，因此常有較多之藍點表現率，但太強之衝擊力容易造成細胞過度傷害，因而影響細胞後續之再生力。在基因鎗設定中射擊距離之重要性，與微載體之大小有密切之關係，亦即較大之微載體飛行距離之影響較小[22]。本研究中使用之金粒子直徑爲0.6 mm、鎢粒子爲0.73 mm，雖然6 cm組有較高之總藍點數，但因培植體個別表現差異大，因而造成處理間差異並不顯著（表4、5）。一般而言，射擊距離愈短往往有較高之藍點數，但因相對細胞受傷較重因此後續之成活率將成爲觀察之重點，本研究中觀察6 cm射擊距離對後續再生並無不良影響，惟因6 cm距離較短，在射擊時常引起培植體彈跳爲其缺點。

大載片至擋片之距離愈遠，則微載體下射之範圍愈集中，往往造成正下方圓心點培植體受到過多之傷害，本試驗之結果以最小間隔環距離 (4 mm) 最佳（表6），除衝擊力較小外，理論上應可有較開展之射擊範圍，可避免粒子過度集中之傷害。

高滲透壓處理因可以提高轉殖效率而經常被使用[24]，在Chen等人之水稻轉殖研究指出使用0.8M碳水化合物高滲透壓處理，每個培養皿之懸浮細胞有650～700個藍點表現，而對照組卻只有6個，差異十分顯著[6]。本試驗以種子或胚盤爲轉殖材料，發現配合高滲透壓培養基處理（0.46M碳水化合物）之轉殖率比對照組 (0.09M) 爲高，其中尤以胚盤培植體處理之效果最佳，胚盤高滲透壓處理影響差異頗大 (11.7 vs. 0.1)，若胚盤培植體未配合高滲透壓處理，其藍點數反而比全粒種子培植體之藍點少，推

測由種子長出之胚盤爲新生之胚性細胞，受到粒子撞擊之傷害較其他組織大，而高滲透壓處理有助於胚盤細胞適應逆境而提高轉殖率。

轉殖質體之構築被認爲是影響外源基因表現效率之重要因素，許多水稻轉殖研究發現，在雙子葉植物經常被使用之CaM35S啓動子，對單子葉之水稻效果往往並非最佳[3]；更有報告指出於轉殖基因中加入單子葉植物之內含子 (intron) 有助於基因之表現[18]，本試驗使用之轉殖質體pZO1052與常用之轉殖質體pBI121比較，其 GUS 基因前插入有單子葉玉米ADH基因內含子亦有較高之基因表現，而兩質體的大小不同 (7.65 vs.13.0 kb)，可能也是影響轉殖效率因素之一。

本研究以台農67號水稻成熟種子爲轉殖材料，針對影響利用基因鎗轉殖之各項因子進行研究，初步建立之資料已例行使用於本研究室轉殖試驗，主要之流程及設定條件爲將成熟種子於預培養之第3～4日將芽鞘去除，以預培養7日後之胚性癒合組織爲轉殖材料，轉殖前4小時至轉殖後16～24小時以高滲透壓培養基處理，金、鎢粒子皆適用於水稻轉殖，但長時間培養似乎以金粒子之表現較佳，基因鎗之設定以1,100psi，大載片至擋片之距離4 mm，微載體至射擊目標之飛行距離6 cm或9 cm（如培植體不會彈跳可使用較短之距離），一般平均藍點數皆可達15～20個藍點/培植體。有關此轉殖系統與其他已發表基因鎗轉殖系統從再生培養經轉殖及篩選後得到基因轉移水稻之整體效率比較目前正進行中。希望經此轉殖基本資料之建立，有助於未來愈來愈多想要利用基因鎗進行台農67號水稻品種及各種不同基因轉殖於水稻之研究者，以更簡單有效率的方法得到轉基因水稻。

誌　謝

本文蒙本所農藝系蔡新聲研究員斧正，特此申謝。感謝王怡雯、蕭淑柃小姐協助本試驗進行。

引用文獻

1. 夏奇鈱、王強生。1998。水稻台農67號胚癒合組織之誘導及再生力研究。中華農業研究47: 338-345。
2. 趙雲洋。1995。利用粒子鎗進行水稻基因轉殖之研究。國立台灣大學農藝研究所 碩士論文。
3. Cao J., X. Duan., D. McElroy, and R. Wu. 1992. Regeneration of resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Rep.11: 586-591.
4. Casas A. M., A. K. Kononowicz, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1995. Cereal transformation through particle bombardment. pp. 235-264.in: Plant Breeding Reviews Vol.13 (Janick J., ed.), John Wiley & Sons. Inc., New York.
5. Chan M. T., T. M. Lee, and H. H. Chang. 1992. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Physiol. 33: 577-583.
6. Chen L., S. Zhang, R. N. Beachy, and C. M. Fauquet. 1998. A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. Plant Cell Rep.18: 25-31.
7. Christou P. 1995. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. Euphytica 85: 13-27.
8. Christou P. 1997. Rice transformation: bombardment. Plant Mol. Biol. 35: 197-203.
9. Chu, C. C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. pp. 43-50. in: Proc. Symp. Plant Tissue Culture. (Hu, H. ed.) Science Press, Peiking, China.
10. Goldfarb B., S. H. Strauss, H. T. Howe, and J. B. Zaerr. 1991. Transient gene expression of microprojectile-introduced DNA in Douglas-fir cotyledons. Plant Cell Rep. 10: 517-521.
11. Hadi M. Z., M. D. McMullen, and J. J. Finer. 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean *via* particle bombardment. Plant Cell Rep. 15: 500-505.
12. Hartke S., and H. Lorz. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from various indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. J. Genet & Breed. 43:2 05-214.
13. Hensgens L. A. M., E. P. H. M. de Bakker, E. P. van Os-Ruygrok, S. Rueb, F. van de Mark, H. M. van der Maas, S. van der Veen, M. Kooman-Gersmann, L. Hart, and R. A. Schilperoort. 1993. Transient and stable expression of *gusA* fusion

with rice genes in rice, barly and perennial ryegrass. Plant Mol. Biol. 22: 1101-1127.

14. Hooykaas P. J. J., and R. A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19: 15-38.
15. Jain, R. K., S. Jain, B. Wang, and R. Wu. 1996. Optimization of biolistic methods for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmati rice plants. Plant Cell Rep. 15: 963-968.
16. Jefferson R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO. 6: 3901-3907.
17. Li L.,R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R. N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep. 12: 250-255.
18. McElroy D., A. D. Blowers, B. Jenes, and R. Wu. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. Mol. Gen. Genet. 231: 150-160.
19. Morrish F., D. D. Songstad, C. L. Armstrong, and M. Fromm. 1993. Microprojectile bombardment: A method for the production of transgenic cereal plants and the functional analysis of genes. pp. 133-171. in: Transgenic plants-fundamental and applications. (Hiatt A. ed.), Marcel Dekker Inc., New York.
20. Ratnayaka I. J. S., and J. H. Oard. 1995. A rapid method to monitor DNA precipitation onto microcarriers before particle bombardment. Plant Cell Rep. 14: 794-798.
21. Rochange F., L. Serrano, C. Marque, C. Teulieres, and A. M. Boudet. 1995. DNA delivery into *Eucalyptus globulus* zygotic embryos through biolistic: optimization of the biological and physical parameters of bombardment for two different particle guns. Plant Cell Rep. 14: 674-678.
22. Sanford J. C., F. D. Smith, and J. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. Methods in Enzymology 217: 483-509
23. Smith R. H., and E. E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. Crop Sci.35: 301-309.
24. Zhang S., L. Chen, R. Qu, P. Marmey, R. Beachy, and C. Fauquet. 1996. Regeneration of fertile transgenic (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. Plant Cell Rep. 15: 465-469.

Optimization Parameters of Particle Bombardment for Tainung 67 Rice (*Oryza sativa* L.) [1]

Chi-Ni Hsia, Hsin-Muh Yen, Tung-Hai Tseng, Woei-Shyuan Jwo and Chang-Sheng Wang[2]

Summary

The objective of this study was to establish a genetic transformation system using biolistic bombardment (Biolistic PDS1000/He device, Bio-Rad) for the most popular rice cultivar 'Tainung 67' in Taiwan. Embryogenic calli were induced from mature seeds on the medium containing 2, 4-D and they were used as material for bombardment. Transformation efficiency was evaluated by the transient expression of β-glucuronidase gene. The tested parameters included: the effect of preculture duration for explants, the type of microcarriers, density of microcarrier particles used for DNA preparation, the effects of osmotic treatments, and plasmids with various constructions. Parameters of biolistic device including the flight distance of microcarriers (6 and 9 cm) and macrocarriers (4, 8, and 12 mm) were investigated. The results showed that 7-day-precultured embryogenic calli had the best responses for bombardment among 2-7 day' preculture duration. Enhanced transformation efficiency was found in the explants treated with high osmotic medium 4h prior to till 24 h after bombardment. Particles of gold and tungsten were both found suitable for rice transformation and there was no adverse effect when tungsten particles were reduced to 1/3 standard amount for DNA precipitation on transient GUS gene expression. However, it was found that gold particle had higher GUS expression at 120 h post-bombardment. A preliminary microprojectile transformation system with an average of 15-20 blue spots/explant GUS expression was routinely obtained for 'Tainung 67' by using the particle gun with 1,100 psi rupture disk, 6 or 9 cm microcarrier flight distance and 4 mm of macrocarrier flight distance setting.

Key words : Rice (*Oryza sativa* L.), Particle gun, Transformation.

---

1. Contribution No.2074 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Research assistant, Assistant Researcher and Associate Researcher of Agronomy Department, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.