

籼稻不育系中 A 完善再生系统的研究^{*}

王亚琴¹, 梁承邨²

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640;

2. 中国科学院华南植物园, 广东 广州 510650)

摘 要: 以籼稻不育系中 A 的种子为外植体, 探讨了培养基配方、外源激素、营养物等对其愈伤组织诱导和绿苗分化的影响。结果表明, 在 NB 培养基中添加 2.5 mg/L 2,4-D 以及脯氨酸、水解酪蛋白、山梨醇等营养物有利于提高籼稻中 A 的愈伤诱导率, 添加外源激素 3.0 mg/L 的 6-BA 和 0.5 mg/L 的 NAA 有利于提高其分化率, 添加 0.1 mg/L NAA 可以使生根率达到 100%。由此初步建立了籼稻中 A 的高效再生系统, 为其遗传转化的顺利进行奠定了基础。

关键词: 籼稻中 A 愈伤组织; 组织培养; 高效再生系统

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2006) 05-0081-04

水稻 *Oryza sativa* L. 是世界上最重要的粮食作物之一, 主要有籼稻和粳稻两个亚种。在水稻的遗传育种研究中, 粳稻的组织培养较容易, 愈伤组织诱导时间短, 而且诱导出来的愈伤组织生长快, 再生率高, 目前许多粳稻品种已建立了重复性好、转化频率高的遗传转化体系^[1-2]。然而经济上更为重要的是籼稻品种, 其栽培面积约占全球 80%, 相对粳稻而言, 籼稻的离体培养力低, 愈伤组织分化成苗难, 尤其是农业生产上推广的籼稻优良品种更是如此。本实验选取的籼稻不育系中 A 是华南地区大力推广的优良品种, 它具有外观品质优、高抗稻瘟病、中抗白叶枯病、分蘖力强而配合力高等优点, 属于水稻杂交工程中应用前途较广的不育系。然而多年来其再生系统的建立一直未得到突破, 直接影响了其在生产上的应用。本实验采用籼稻中 A 的成熟胚为外植体, 通过培养基中各种元素的调配、外源激素和营养物的添加等对影响愈伤组织诱导、分化和生根的因素进行了较为系统的研究, 以期建立高效再生系统, 为籼稻不育系中 A 建立完善的遗传转化体系提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试水稻 *Oryza sativa* L. 品种一中 A 是华南地区的优质籼稻品种, 由中国科学院华南植物研究所提供。

1.2 植物培养基

在基本培养基 NB (N6+B5) 中添加不同的营养物和激素配制如下培养基:

诱导 (继代) 培养基 (Y): NB 基本培养基 + Pro (脯氨酸) 500 mg/L + CH (水解酪蛋白) 300 mg/L + 2,4-D 2.5 mg/L + Sorbitol (山梨醇) 15 g/L + Sucrose (蔗糖) 15 g/L + Phytagel (植物凝胶) 3.0 g/L pH=5.8

预分化培养基 (YF): NB 基本培养基 + Pro 500 mg/L + CH 300 mg/L + 6-BA 2 mg/L + NAA 1 mg/L + ABA 5 mg/L + Sorbitol 15 g/L + Sucrose 15 g/L + Phytagel 3.0 g/L pH=5.8

分化培养基 (F): NB 基本培养基 + Pro 500 mg/L + CH 300 mg/L + 6-BA 3 mg/L + NAA 0.5 mg/L + Sorbitol 15 g/L + Sucrose 15 g/L + Agar (琼脂粉) 8.6 g/L pH=5.8

生根培养基 (SG): 1/2 MS 大量、微量元素及铁盐 + 1/2 维生素 B5 + NAA 0.1 mg/L + Sucrose 30 g/L + Agar 8.6 g/L pH=5.8

1.3 外植体处理

水稻种子去壳后, 先用 $\varphi=70\%$ 酒精消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 再用 $\varphi=0.1\%$ 升汞浸泡 20 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次, 用滤纸吸去多余的水分, 放置到培养基上诱导愈伤, 7~10 d 后将愈伤切下进行继代试验。

* 收稿日期: 2006-04-28

基金项目: 广东省国际合作资助项目 (2004B50201021); 广州市科技计划资助项目 (2004J1-C0231)

作者简介: 王亚琴 (1972—) 女, 博士, 讲师; Email: yqwang@scut.edu.cn

1.4 继代与分化

愈伤诱导及其继代培养均于 26~28℃, 24 h 黑暗条件下进行。分化培养条件为: 26~28℃, 14 h 光照培养, 光强 1 000~1 500 lx。愈伤从胚上剥离后活力旺盛, 生长较快, 所以第 1 次继代间隔时间不宜过长, 5~7 d 后即可继代, 此后 10 d 继代 1 次。

1.5 生根、炼苗与移栽

当苗长至 5~8 cm 时即可转入生根培养基诱导生根, 大约 1~2 周根已长粗、长密时便可除去瓶盖炼苗 2~3 d 然后取出, 细心洗净根部残留的培养基移植到无阳光直射的网盆中, 并罩以塑料薄膜, 加入大量水保持一定湿度, 成活后可移至大田种植。

2 实验结果

2.1 不同培养基配方处理对籼稻中 A 愈伤组织诱导率的影响

MS、B5 和 N6 是 3 种在水稻愈伤组织培养中应用最为普遍的培养基, 三者的成分明显不同, 对愈伤组织诱导和植株再生的效应也明显不同。本实验设置了 6 种不同的培养基, 分别为 MS、B5、N6、NB (N6+B5)、MB (MS+B5)、NMB (N6+MS+B5)。籼稻中 A 在其中培养 26 d 后, 统计愈伤组织诱导率, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 6 种培养基对籼稻中 A 的愈伤组织诱导率均无显著影响, 但在 NB 培养基中其愈伤组织诱导率最高。说明 NB 对提高籼稻的愈伤组织诱导率有一定的作用。

表 1 不同培养基对籼稻中 A 愈伤组织诱导的影响¹⁾

Tab 1 Effects of different media on induction of callus from indica rice Zhong A

培养基	接种外植体数/块	愈伤组织诱导率/%
MS	68	59.8
B5	75	64.3
N6	70	61.2
NB	65	68.4
MB	72	62.4
NMB	70	53.7

1) 愈伤组织诱导率=愈伤组织发生数/接种外植体数×100%

2.2 不同激素质量浓度对籼稻中 A 愈伤组织诱导率的影响

在 NB 培养基中添加质量浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 的 2,4-D, 培

养 26 d 后调查其愈伤组织诱导状况, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 添加不同质量浓度的 2,4-D 对籼稻中 A 的愈伤诱导率有显著的影响, 说明籼稻中 A 愈伤组织的诱导受 2,4-D 质量浓度影响较大, 其中 2,4-D 质量浓度为 2.5~3.0 mg/L 时可获得较高的诱导率。

表 2 不同质量浓度 2,4-D 对籼稻中 A 愈伤组织诱导的影响

Tab 2 Effects of 2,4-D concentration on induction of callus from indica rice Zhong A

2,4-D 质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	接种外植体数/块	愈伤组织诱导率/%
0.5	60	29.4
1.0	60	33.6
1.5	60	47.1
2.0	60	53.2
2.5	60	67.1
3.0	60	65.6

2.3 营养添加物对籼稻中 A 愈伤组织诱导率的影响

在 NB 培养基中添加甘露醇、脯氨酸、水解酪蛋白、山梨醇等营养物, 培养 26 d 后观察其愈伤组织诱导情况, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 不同营养添加物处理对籼稻中 A 愈伤组织诱导率有显著的影响, 其中营养物的配合添加对籼稻中 A 愈伤诱导率的影响胜过单一营养物, 以水解酪蛋白+山梨醇、脯氨酸+水解酪蛋白+山梨醇为最, 使其愈伤组织诱导率高达 85%。在单一营养物的处理中, 山梨醇对籼稻中 A 愈伤组织诱导率的影响较其他三种营养物大。

表 3 不同营养添加物对籼稻中 A 愈伤组织诱导率的影响

Tab 3 Effects of different nutrient substances on induction of callus from indica rice Zhong A

营养添加物	接种外植体数/块	愈伤组织诱导率/%
甘露醇	60	56.1
脯氨酸	60	61.4
水解酪蛋白	60	54.7
山梨醇	60	67.2
甘露醇+脯氨酸	60	62.3
甘露醇+水解酪蛋白	60	69.5
脯氨酸+水解酪蛋白	60	63.3
脯氨酸+山梨醇	60	77.7
水解酪蛋白+山梨醇	60	84.6
脯氨酸+水解酪蛋白+山梨醇	60	85.1

2.4 不同外源激素配合对籼稻中 A 愈伤组织分化的影响

在基本培养基 NB 上添加不同比例的 6-BA 与 NAA 测试了不同外源激素组合对籼稻中 A 愈伤组织分化特性的影响。实验发现在愈伤组织开始分化时, 添加 6-BA 的处理较易出芽, 而且 6-BA 的浓度要高于 2 mg/L。从表 4 中可以看出, 在添加 6-BA 3.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 的处理中, 籼稻中 A 的绿苗分化率高达 65.3%, 成苗率达 113.8%。

2.5 不同外源激素配合对籼稻中 A 再生苗生根的影响

在元素减半的 MS 培养基上附加不同的外源激素组合, 测试籼稻中 A 绿苗的生根能力 (表 5), 供试的 7 个组合中 5 个生根率在 85% 以上, 只有加了细胞分裂素 KT0.1 和 6-BA 的组合生根率较低, 为 55% 左右, 而且其根系多分枝, 长势弱, 这说明在生根培养基中附加细胞分裂素对根系的生长发育有一定程度的抑制。但在未加激素的培养基上取得了

表 4 不同外源激素配合对籼稻中 A 愈伤组织分化的影响¹⁾

Tab 4 Effects of exogenous hormones on callus differentiation from Indica rice Zhong A

植物激素 / (mg·L ⁻¹)	绿苗分化率 / %	成苗率 / %
6-BA 3.0 + NAA 0.5	65.3	113.8
6-BA 2.5 + NAA 0.5	52.3	92.0
6-BA 2.0 + NAA 0.5	42.1	73.7
6-BA 1.5 + NAA 0.5	42.0	77.3
6-BA 1.0 + NAA 0.5	50.7	81.7
6-BA 0.5 + NAA 0.5	44.9	72.7

1) 绿苗分化率 = 成苗的愈伤组织数 / 转入分化培养基的愈伤组织数 × 100%
成苗率 = 绿苗数 / 转入分化培养基的愈伤组织数 × 100%

很好的生根效果, 说明水稻本身很易生根, 附加外源激素并不是必需的, 只是适当浓度 NAA 的添加会使生根率达到 100%。

表 5 不同外源激素配合对籼稻中 A 再生苗生根特性的影响¹⁾

Tab 5 Effects of exogenous hormones on rooting of shoots regenerated from indica rice Zhong A

植物激素	分化的绿苗数	生根的绿苗数	生根率 / %	根的形态
NAA 0.1	23	23	100	Thick long
NAA 0.5	20	17	85.5	Thick long
NAA 0.5 + KT 0.1	23	12	52.2	Thin short
NAA 0.5 + 6-BA 0.1	25	14	56.0	Thin short
IAA 0.5	19	17	89.5	Thick long
IBA 0.5	21	19	90.5	Thick long
0	27	23	85.2	Thick long

1) 生根率 = 生根的绿苗数 / 分化的绿苗数 × 100%

3 结果与讨论

籼稻的离体培养困难一直是制约其基因转化成功的关键环节之一, 与幼胚、幼穗等外植体相比, 以成熟胚作为外植体进行愈伤组织诱导和绿苗分化则更难成功, 然而成熟胚具有取材不受时间和季节限制、操作简便的优点, 因此提高成熟胚的培养力和植株再生能力对水稻转基因研究具有重要意义。

水稻胚性愈伤的诱导是水稻遗传转化中的重要环节, 胚性愈伤的状态直接影响着遗传转化频率。所以, 提高良好生长状态的胚性愈伤的数量是提高转化频率的关键^[3]。胚性愈伤的诱导不仅跟水稻基因型有关, 同时也受许多组织培养因素的影响。培养基成分是最关键的因子。本实验比较了 6 种培养基配方, 发现 NB 培养基对提高籼稻中 A 的愈伤

组织诱导率有一定的作用, 诱导的胚性愈伤多且胚性强, 生长和分裂旺盛, 分化率高, 适宜籼稻中 A 的培养。在水稻愈伤组织诱导中, 一般认为 2,4-D 是不可缺少的外源激素^[4-5], 在培养基中只需添加 2.0 mg/L 的 2,4-D 就可获得较高的诱导率^[6]。然而在籼稻中 A 的诱导中, 本试验发现 2,4-D 的最适添加浓度为 2.5~3.0 mg/L。同时培养基中还应添加脯氨酸、水解酪蛋白、山梨醇等营养物质, 这样不仅能进一步提高愈伤组织诱导率, 而且显著地改善了愈伤组织的生长状态, 使之尽快进入旺盛生长阶段。

水稻绿苗分化率的提高一直是育种工作者们要解决的问题。在分化培养基中加入山梨醇, 不仅可提高渗透压, 也有利于水稻愈伤组织的分化^[7], 又可作碳源^[8]。本研究结果显示, 在诱导和分化

培养基中添加适量山梨醇,降低蔗糖含量,不仅可以提高愈伤组织诱导率而且对植株再生有显著的促进作用。原因可能是培养基中渗透压高,还原力强,可抑制酚类物质的形成,防止愈伤组织褐化;而且山梨醇氧化可形成葡萄糖或果糖,进而在植物细胞内形成蔗糖或麦芽糖,补充碳源,从而促进愈伤组织分化。同时发现在愈伤组织进入分化阶段之前,将其放入加有 ABA 的预分化培养基中,一周的培养就能使大部分愈伤组织变得结构致密,呈颗粒状,大大提高了分化效率,与黄学林^[9]认为低浓度的 ABA 对保持愈伤组织的致密、稳定、结节状结构,提高愈伤组织的胚性具有重要作用观点一致。

本研究还发现,在愈伤组织分化以及绿苗生根时,将植物凝胶换为琼脂粉可使绿苗的分化率、生根率大大提高,而且绿苗的长势很好,这可能是植物凝胶与琼脂粉不仅起固化作用,而且本身的成分对组培苗有一定作用,而琼脂粉的成分较适合绿苗的分化以及生长,也可能是琼脂粉呈不透明状可以减弱培养基的光照,或者是其成分中微量元素从总量上调节培养基中元素的平衡。具体原因还需进一步研究。

参考文献:

- [1] CHAND S, SAHRAWAT A K. Stimulatory effect of partial desiccation on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal Plant Biotechnology and Biotechnology 2001, 10: 43-47.
- [2] 易自力, 曹守云, 王力, 等. 提高农杆菌水稻转化频率的研究 [J]. 遗传学报, 2001, 28 (4): 352-358.
- [3] 沈革志, 张建军, 殷丽青, 等. 根癌农杆菌介导的 *Ds* 转因子的水稻遗传转化 [J]. 上海农业学报, 1998, 14 (4): 7-12.
- [4] SAHARAN V, YADAV R C, YADAV N R, et al. High frequency plant regeneration from desicca calli of indica rice fed transgenic (*Oryza sativa* L.) [J]. African Journal of Biotechnology 2004, 13 (5): 256-259.
- [5] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻幼胚愈伤组织形成和植株再生的若干因素 (简报) [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35 (2): 113-115.
- [6] 刘选明, 周朴华. 影响水稻幼穗培养体细胞胚胎发生因素的研究 [J]. 生物工程学报, 1998, 14 (3): 314-319.
- [7] 琼英, 王润华. 山梨醇对籼稻愈伤组织培养效应 [J]. 华南农业大学学报, 1991, 12 (1): 36-42.
- [8] 黄慧君, 黄道强. 山梨醇对水稻体细胞培养的特殊作用 [J]. 中国水稻科学, 1999, 13 (14): 248-250.
- [9] 黄学林. 高等植物组织离体培养的形态建成及其研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1995. 44-45, 171-172.

Efficient Plant Regeneration from in Vitro Culture of Indica Rice Zhong A (*Oryza sativa* L.)

WANG Ya-qin¹, LIANG Cheng-yu²

- (1. College of Bioscience and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
- (2. South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Factors affecting the callus induction and shoot differentiation of indica rice Zhong A, such as media, exogenous hormones and nutrient substances, etc., were investigated. The results showed that high induction frequency of mature seeds derived embryogenic calli was initiated on NB medium supplemented with 2.5-3.0 mg/L 2,4-D and nutrient substances such as proline, casein acid hydrolysate and D-sorbitol. High differentiation frequency was obtained on NB medium supplemented with 3.0 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA, and 100% rooting frequency was obtained on NB medium supplemented with 0.1 mg/L NAA. Therefore a high efficient regeneration system from in vitro culture of indica rice Zhong A was established for genetic transformation.

Key words: Indica rice Zhong A, callus, tissue culture, high efficient regeneration