

几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素

刘元凤^{1,2} 刘彦卓¹ 贺红³ 王金花^{1,2} 李玲² 李晓方^{1,*}

¹广东省农业科学院水稻研究所, 广州 510640; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; ³莱阳农学院农学系, 莱阳 265200

摘要 建立了适合5个籼稻品种成熟胚籼稻遗传转化的高效植株再生体系。N6基本培养基有利于籼稻愈伤组织的诱导和继代培养; N6大量元素和MS微量元素有利于愈伤组织的分化。降低分化培养基中蔗糖含量, 加入适量山梨醇、Cu²⁺、Ag⁺和玉米素(ZT)均可明显提高水稻愈伤组织的再生植株频率, 5个品种分化频率均达到75%以上。

关键词 籼稻; 成熟胚; 愈伤组织; 再生植株

Factors Influencing of Callus Induction and Plantlet Regeneration from Mature Embryos in Indica Rice

LIU Yuan-Feng^{1,2}, LIU Yan-Zhuo¹, HE Hong³, WANG Jin-Hua^{1,2}, LI Ling², LI Xiao-Fang^{1,*}

¹Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640; ²College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; ³Department of Agronomy, Laiyang Agricultural College, Laiyang 265200

Abstract A high efficient regeneration system of five indica rice suitable for genetic transformation were established. N6 medium was suitable for calli induction and subculture of indica rice. The N6 macroelements and the MS microelements were advantageous to callus formation. By reducing sucrose and supplementing with sorbitol, copper, silver and zeatin(ZT) to the media, the plantlet regeneration frequencies were evidently increased. The plantlet regeneration frequencies of five varieties were over 75% in these media.

Key words indica rice; mature embryo; callus; plantlet regeneration

业已建立的水稻3个亚种粳稻、籼稻和爪哇稻的农杆菌转化体系^[1~3], 主要针对某些模式品种, 并不适用于各水稻亚种内的所有品种。这些水稻分化再生培养体系的常用外植体是幼胚、幼穗、花粉粒和花药, 其绿苗分化频率虽然高, 但材料来源受季节限制, 实用性常受到一定程度的影响。相对于幼胚和幼穗等外植体, 成熟胚取材不受季节限制, 应用于遗传转化最为便利。3个亚种中, 籼稻组培再生能力低^[4], 仅有少数品种可用于遗传转化。本文主要探讨不同基本培养基中大量元素与微量元素组合、渗透压、生长调节物质配比、山梨醇、Cu²⁺和Ag⁺对水稻愈伤组织再生频率的影响, 并建立和优化了水稻成熟胚诱导愈伤组织分化再生植株体系, 可供高效农杆菌介导的籼稻遗传转化体系参考。

材料与方法

5个籼稻(*Oriza sativa* sub. *indica*)品种矮秀占、绿黄占、茉莉新占、绿源占7号和粤香占均由广

东省农业科学院水稻研究所育成。

分别在5个品种中挑选健康籽粒, 手工剥去颖壳, 用75%酒精表面消毒2 min, 再放入3.75%次氯酸钠溶液消毒40 min, 无菌水冲洗3~5次, 然后接种到各诱导培养基上。每个处理接种15瓶, 每瓶18粒, 重复3次, 置于25~26℃下暗培养, 以诱导愈伤组织。10 d后, 统计5个材料愈伤组织诱导率并观察愈伤组织质量状态。挑选表面干爽、结构致密的愈伤组织, 转到诱导培养基上或4种组合继代培养基(表1)上, 继代培养1~2次, 每次7~10 d, 观察和比较2种培养基对愈伤组织继代培养的影响。

愈伤组织的分化和生根培养时, 从继代1~2次的愈伤组织(每10 d继代1次)中挑选表面干爽结构致密的愈伤组织置于高温灭菌的50 mL三角瓶

收稿 2003-09-15 修定 2004-02-09

资助 国家自然科学基金重点项目(30040025)。

* 通讯作者(E-mail: lixiaofang38@263.net, Tel:020-85266185)。

表1 愈伤组织诱导、继代、分化和生根培养基的成分

Table 1 Components of media for callus induction, subculture, plantlet regeneration and rooting

培养基	组成成分/mg·L ⁻¹
N6D	N6 ^[5] + 脯氨酸 500+ 水解酪蛋白 (CH) 300+2, 4-D 2+ 琼脂 7 g·L ⁻¹ + 蔗糖 30 g·L ⁻¹ , pH 5.8
NB	N6 大量+B5 有机、微量+ 脯氨酸 500 +CH 300+2, 4-D 2+ 琼脂 7 g·L ⁻¹ + 蔗糖 30 g·L ⁻¹ , pH 5.8
ND	N6+脯氨酸 2.8 g·L ⁻¹ +CH 300 +2, 4-D 2+ 蔗糖 30 g·L ⁻¹ + 琼脂 8 g·L ⁻¹ , pH 5.7
NMB	N6 大量+MS 微量+B5 有机+ 谷氨酰胺 250+ 脯氨酸 500+CH 300+2, 4-D 2+ 蔗糖 30 g·L ⁻¹ + 琼脂 8 g·L ⁻¹ , pH 5.8
MS	MS ^[6] + 脯氨酸 500+CH 300 +2, 4-D 2+ 琼脂 8 g·L ⁻¹ + 蔗糖 30 g·L ⁻¹ , pH 5.8
J1	N6D+ 甘露醇 12 g·L ⁻¹ , pH 5.8
J2	J1+ZT 0.5+NAA 1, pH 5.8
J3	NB+ABA 3+ 甘露醇 12 g·L ⁻¹ , pH 5.8
J4	NMB+6-BA 0.25 +NAA 0.5 + 甘露醇 12 g·L ⁻¹ , pH 5.8
R1	N6 大量、有机+2倍MS 微量+CH 1 000 +6-BA 2 +NAA 0.2+ 蔗糖 30 g·L ⁻¹ + 琼脂 8 g·L ⁻¹ , pH 5.8
R2	大量、微量、有机、CH、6-BA、NAA 及琼脂同R1+ 山梨醇 20 g·L ⁻¹ + 蔗糖 10 g·L ⁻¹ , pH 5.8
R3	R2+ AgNO ₃ 4, pH 5.8
R4	R2+CuSO ₄ 0.8, pH 5.8
R5	R2+ZT 0.5, pH 5.8
R6	MS 大量、微量+N6 有机+CH、6-BA、NAA、CuSO ₄ 、山梨醇、蔗糖及琼脂同R2, pH 5.8
R7	MS 大量及2倍微量+N6 有机+CH、6-BA、NAA、CuSO ₄ 、蔗糖及琼脂同R2, pH 5.8
R8	N6+CH、6-BA、NAA、CuSO ₄ 、山梨醇、蔗糖及琼脂同R2, pH 5.8
R9	R2+ 脯氨酸 500, pH 5.8
Mo	1/2MS +CH 1 000 +NAA 0.5 + 蔗糖 30 g·L ⁻¹ + 琼脂 8 g·L ⁻¹ , pH 5.8

N6D、NB、ND、NMB、MS 为诱导培养基; J1、J2、J3、J4 为继代培养基; R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9 为分化培养基; Mo 为生根培养基。

中, 用高温灭菌的2层牛皮纸封口, 干燥3~5 d, 转入9种组合的分化培养基上, 置于25~27℃光照下培养(12 h光照/12 h黑暗, 光照度为0.04 mmol·m⁻²·s⁻¹) 5周左右, 15 d更换1次培养基, 诱导芽的分化, 30 d时统计小苗分化率。绿苗高约5~8 cm时, 转移到生根培养基上, 促进根的生长, 根的生长率为100%。3~4周后, 用自来水将附在幼苗上的培养基冲洗干净, 移栽到温室中炼苗(盆栽, 即土壤培养)。3 d后, 放在室外培养至成熟, 成活率为100%。在对水稻成熟胚愈伤组织的各分化培养条件进行初步优化基础上, 选取R1为基本分化培养基, 另添加适当浓度的山梨醇、CuSO₄、AgNO₃、ZT, 观察这些物质对愈伤组织分化的影响。

结果与讨论

1 培养基成分对水稻成熟胚愈伤组织诱导率的影响

MS和N6是两种在水稻愈伤组织培养中应用最为普遍的培养基, 两者的成分明显不同, 对愈伤

组织诱导和植株再生的效应也明显不同。从表2可以看出, 5个品种在N6D^[7]和NB培养基上的愈伤组织诱导率比NMB约高50%, 比MS约高40%; 在ND上愈伤组织诱导率虽为57%~72%, 但诱导的愈伤组织结构致密、呈颗粒状、表面光滑、生长旺盛(图1-a、b), 而在NMB和MS上形成的愈伤组织呈不分散的表面水浸状, 很难分化成苗。说明N6培养基利于愈伤组织的诱导, 而含MS基本成分的培养基则不利于愈伤组织的诱导; 在愈伤组织的诱导过程中, 添加脯氨酸能明显地促进

表2 水稻成熟胚在不同培养基上愈伤组织的诱导率
Table 2 Callus induction rate in various induction media

培养基	愈伤组织的诱导率/%				
	茉莉新占	绿黄占	粤香占	矮秀占	绿源占7号
N6D	95	97	97	92	90
NB	95	98	97	90	91
ND	65	72	63	57	58
NMB	40	41	35	33	37
MS	53	55	48	45	40

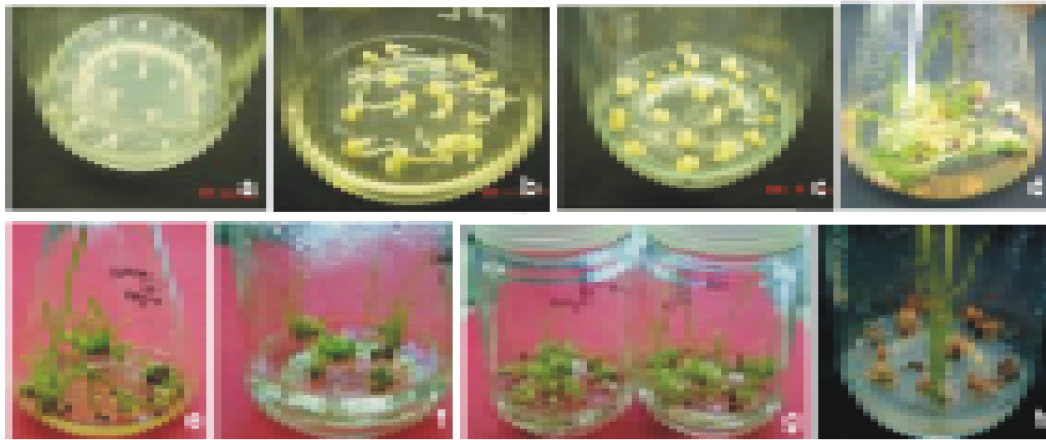


图1 茉莉新占成熟胚诱导的愈伤组织及其再生植株

Fig. 1 The calli from mature embryos and the plantlets of 'Molixinzhan'

a. 诱导4 d的成熟胚; b. 诱导10 d的愈伤组织; c. 在诱导培养基上继代7 d的愈伤组织; d. 添加 AgNO_3 (R3)后分化呈现的畸形小苗; e. 添加 CuSO_4 (R4)后分化形成的小苗; f. 添加ZT (R5)后长成的小苗; g. 左为未添加微量元素 CuSO_4 (R2), 右为添加 CuSO_4 (R4)后长成的小苗; h. 在MS基本培养基 (R7)上长成的小苗。

愈伤组织的生长。由于品种差异, 5个品种中, 以绿黄占在NB上形成的愈伤组织的结构和颜色较好, 其他4个品种的较差。以上说明, N6D和ND较适合作为这5个品种愈伤组织的诱导培养基。

2 愈伤组织的继代培养

将在N6D和ND诱导10~12 d的愈伤组织(图1-b)从萌发的种胚剥离开来, 转移到诱导培养基上或4种继代培养基上继续培养。第5天观察, 诱导培养基和继代培养基上的愈伤组织状态没有显著差异。而7 d后, 特别是第10天时, 继代培养基上愈伤组织虽然渐渐长大, 但结构疏松, 颗粒细而分散, 色泽较暗; 诱导培养基上继续培养的愈伤组织则结构致密, 颗粒状呈分散少, 颜色鲜黄, 易分化成苗^[8](图1-c)。实验结果表明, 在继代培养时, 添加细胞分裂素、ABA和甘露醇并非对所有水稻品种愈伤组织的继代培养都有利。如果初代培养的愈伤组织质量状态较好, 继代时可选用初代培养基。

3 植株的再生

MS含有比N6浓度高且种类多的微量元素, 因而诱导再生植株效果更好^[9]。在培养基中添加2~3倍的MS微量元素, 植株再生频率有显著提高^[10]。从表3可以看出, 5个品种在相同大量元素的情况下, R1、R2、R3、R4及R5有利于植株再生, R8抑制植株再生; 在相同微量元素情况下, R1、

R2、R3、R4及R5有利, 而R6和R7则抑制植株再生。表明N6大量元素和MS微量元素组合的培养基有利于植株再生, 而含MS大量元素的培养基则抑制植株再生(图1-h), 但在生根培养时, MS大量元素和N6大量元素对植株根系生长没有差异。在分化培养基R9上添加脯氨酸后, 植株的分化受到明显的抑制, 说明脯氨酸在愈伤组织分化时, 可能通过螯合铜离子来抑制不定芽的萌发, 延缓不定芽的形成。而朱根发和余毓君^[9]认为脯氨酸有利于愈伤组织分化。

在分化培养基中加入山梨醇, 不仅可提高渗

表3 不同品种水稻在不同分化培养基上的分化频率
Table 3 Plantlet regeneration frequencies of five varieties indifferent media

培养基	愈伤组织的分化频率/%				
	茉莉新占	绿黄占	粤香占	矮秀占	绿源占7号
R1	7.0	2.0	5.4	3.2	0
R2	35.8	15.0	41.1	24.6	22.3
R3	88.9	87.5	87.3	80.0	79.3
R4	84.6	80.0	86.4	75.0	75.5
R5	86.7	78.0	78.3	74.4	75.3
R6	16.0	5.0	11.5	1.6	0
R7	3.0	0	1.7	0	0
R8	34.8	31.2	40.3	34.4	33.9
R9	23.0	12.0	10.0	17.0	5.0

透压,也有利于水稻愈伤组织的分化^[12],又可作碳源^[13]。我们的结果显示,在分化培养基中添加适量山梨醇,降低蔗糖含量,对植株再生有显著促进作用。分化培养基R2中添加20 g·L⁻¹山梨醇,蔗糖含量降低至10 g·L⁻¹,植株再生频率明显高于R1。以上表明提高山梨醇与蔗糖的比例有利于愈伤组织分化。这种分化培养基可能是渗透压高,还原力强,可阻抑酚类物质的形成,防止愈伤组织褐化;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。如果不降低蔗糖含量,植物则优先利用蔗糖,以致山梨醇的作用明显降低。

以铜、银短时间处理水稻愈伤组织可增强愈伤组织中过氧化物酶(POX)活性,从而诱导水稻愈伤组织绿苗分化^[14];杨跃生等^[10]也认为在分化培养基中添加5 μmol·L⁻¹ CuSO₄,是提高水稻愈伤组织小苗分化率简单而有效的方法。本文结果显示,分化培养基R4中添加0.8 mg·L⁻¹ CuSO₄,至第4天时,可见到一些愈伤组织表面出现含有叶绿素的半球状多细胞的绿色区域,2周后大部分绿色区域开始形成幼芽,很少褐化(图1-e、g右);R2中不含CuSO₄,培养到第4天时,其愈伤组织表面未见到这种变化,继续培养到10 d时,才有绿点出现(图1-g左),20 d时少数绿点区域开始形成幼芽。说明CuSO₄能促进芽的形成,提高绿苗形成率。

AgNO₃可促进植物离体器官发生。农杆菌介导甘蓝型油菜时,AgNO₃促进转化的油菜外植体芽的再生,提高转化率^[15];Gil等^[16]在水稻遗传转化时观察到,AgNO₃可克服植物细胞的超敏反应。我们的结果表明,分化培养基R3上添加了4 mg·L⁻¹ AgNO₃,1周内愈伤组织的体积明显增大,10~14 d时,大部分愈伤组织表面有绿点区域出现,并逐渐形成幼芽,每颗愈伤分化小苗的数量比添加铜元素还多,植株再生率稍高于分化培养基R4,但是幼叶生长不健壮,略呈畸形。因此出现这种现象时,我们认为应尽快将小苗移到生根培养基上,以利其正常生长(图1-d)。

细胞分裂素可以促进叶绿素合成和叶绿体的形成^[8]。分化培养基R5中含有ZT,植株再生率略低于分化培养基R3和R4,但加ZT后,再生

苗颜色较深绿,幼苗较粗壮。再生植株生长健壮,节间缩短,叶片增宽,叶色深绿(图1-f)。

总之,9种分化培养基中,R3、R4和R5对5个品种成熟胚诱导愈伤组织再生苗分化率明显高于其他的分化培养基。因此,我们选择R4为愈伤组织分化培养基,建立了农杆菌介导的遗传转化的高效再生体系(图1-e)。

参考文献

- 1 刘巧泉,张景六,王宗阳等.根瘤农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立.植物生理学报,1998,24(3):259~271
- 2 翟文学,李晓兵,田文忠等.由根瘤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.中国科学(C辑),2000,30(2):200~206
- 3 Dong JJ, Teng WM, Buchholz WG et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice. Mol Breeding, 1996, 2: 267~276
- 4 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.植物生理学通讯,1999,35(2):113~115
- 5 Chu CC, Wang CC, Sun CS et al. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sin, 1975, 18: 659~668
- 6 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiol, 1962, 15: 473~493
- 7 Toki S. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol Biol Rep, 1997, (15): 17~21
- 8 田文忠.提高籼稻愈伤组织再生频率的研究.遗传学报,1994,21(3):215~221
- 9 杨跃生,简玉瑜.影响水稻愈伤组织再生植株数量和质量的因素.农业生物技术学报,1996,4(4):124~128
- 10 杨跃生,简玉瑜,郑迎冬.铜在水稻愈伤组织培养再生植株的促进作用.中国水稻科学,1999,13(2):95~98
- 11 朱根发,余毓君.水稻愈伤组织状态的调控.华中农业大学学报,1995,2:213~218
- 12 琼英,忘润华.山梨醇对籼稻愈伤组织培养效应.华南农业大学学报,1991,12(1):36~42
- 13 黄慧君,黄道强.山梨醇对水稻体细胞培养的特殊作用.中国水稻科学,1999,13(14):248~250
- 14 袁玲.铜、银元素对水稻愈伤组织绿苗分化率的作用.湖北农业科学,2003,(1):17~19
- 15 高武军,王景雪,卢龙斗等.硝酸银在油菜基因转化中的影响作用.中国农学通报,2002,18(4):43~45
- 16 Gil A, Enríquez-obregón, Dmitri L et al. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. Plant Cell Tissue Org Cult, 1999, 59: 159~168