

文章编号: 1003-8701(2006)04-0030-04

粳稻成熟胚高频率再生因素的研究

郝文媛¹, 王丕武^{2*}, 林秀峰¹, 姚丹², 武丽敏²

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学生物中心, 长春 130118)

摘要: 以水稻成熟胚为外植体, 就不同基因型、不同激素浓度对愈伤组织诱导、继代及分化的影响进行研究, 并建立了水稻成熟胚高频再生系统。研究表明: NMB、NB、CC 为较适宜的培养基, 可以用于北方粳稻愈伤组织的诱导; 在诱导过程中加入 2,4-D 1~2 mg/L 有利于愈伤组织的诱导; 在继代的过程中加入甘露醇 4 g/L 可明显改善愈伤组织的质量; 诱导分化时, 进行预分化-分化培养可以显著提高分化率。

关键词: 水稻; 成熟胚; 高效; 再生系统

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

关于水稻的组织培养前人有过许多研究, 已有从根尖、节、盾片、叶鞘、胚芽鞘、花药、原生质体、胚囊、幼胚、叶片和幼穗等^[1]组织上成功进行离体再生培养的报道, 但上述取材多受季节和环境影响, 尤其在北方, 难以满足常年实验的要求。目前, 越来越多的研究者开始使用成熟的种子作为受体材料, 期待从成熟的种胚中诱导出高质量愈伤组织, 用于水稻遗传转化。

本研究针对粳稻成熟胚出愈率低、所获愈伤组织质量差、分化率和出苗率低的问题。详细研究不同基因型、不同培养基对水稻愈伤组织诱导和再生的影响, 并由此建立水稻高频率再生系统。

1 材料与方法

1.1 实验材料及培养基

粳稻品种(系): 农大 3 号、丰优 501、超产 2 号、农大 13 和农大 19。

培养基: NMB、NB、CC、MS、正 14、N₆^[2]。

1.2 实验方法

选取无病斑的成熟种子去壳, 用 70%乙醇漂洗 1 min, 然后用 0.1%升汞浸泡 10 min, 并用磁力搅拌器不断搅拌, 再用无菌水漂洗 3~5 次, 最后用无菌滤纸吸干, 将消毒后的种子接种在诱导培养基上, 于 26℃ 黑暗的条件下诱导愈伤组织。在诱导培养基上培养 5~7 d 拔去胚芽, 然后继续诱导培养。20~30 d 后转到继代培养基中, 15 d 左右继代 1 次。继代 1~3 月进行愈伤组织的分化培养。

计算公式:

愈伤组织诱导率 = 愈伤组织块数 / 接种粒数 × 100%

愈伤组织致密率 = 致密愈伤组织块数 / 接种愈伤组织粒数 × 100%

增重指数 = 继代后愈伤组织质量 - 初始愈伤组织重量 / 初始愈伤组织质量

分化率 = 分化出绿苗的愈伤组织块数 / 分化的愈伤组织块数 × 100%

2 结果与分析

收稿日期: 2006-04-14

基金项目: “国家转基因植物中试及产业化基地”专项基金(J99-B-001)和吉林省科技厅项目资助

作者简介: 郝文媛(1977-), 女, 硕士。主要从事植物遗传转化和分子育种研究。

* 通讯作者: 王丕武

2.1 成熟胚愈伤组织的获得

实验证明,应用70%乙醇1 min+0.1%升汞10 min的方法消毒时间短,效果好,污染率为0。研究发现在同一培养条件下不同品种拔芽时间不同,一般取芽长0.7~1.3 cm,在此范围内,拔芽效果好,较易获得大量的愈伤组织,成熟的种子在诱导培养基上一般在5~7 d拔去胚芽。成熟种子获得大量愈伤组织的时间一般为30 d左右。

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

水稻成熟胚诱导的愈伤组织分为两种类型:一是浅黄色或黄色,结构松散,生长比较旺盛,愈伤组织的分化频率比较低;二是乳白色,结构致密,质地较坚硬,生长较缓慢,近似于胚性愈伤组织,分化频率高。

不同种类培养基对5个水稻品种的综合诱导效果差别很大,其中NMB、CC、MS、N₆的诱导率都达到80%以上,但致密愈伤组织诱导率差别显著,只有NMB、NB和CC较好,致密愈伤组织诱导率超过50%,而N₆仅为21.05%。所以,NMB、NB和CC是较适宜的培养基,可用于水稻愈伤组织的诱导(表1)。

表1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

培养基种类	接种数 (粒数)	愈伤组织 (块数)	致密愈伤组织 (块数)	愈伤组织诱导率 (%)	致密愈伤诱导率 (%)
NMB	98	84	70	85.71	71.43
NB	52	104	84	68.42	55.26
CC	112	98	64	81.67	53.33
MS	92	86	34	93.48	36.96
正14	128	80	28	62.50	21.88
N ₆	114	102	24	89.47	21.05

对水稻品种农大19而言,6种培养基对其诱导率和致密率差异显著,差异水平分别为33.22%和36.61%,这表明在水稻受体系统的建立过程中,选择适宜的培养基是十分必要的(图1)。

2.2.2 不同基因型愈伤组织诱导的差异

实验选用的6种培养基中,NMB表现对5个水稻品种的诱导率和致密率最佳。不同的水稻品种诱导率和致密率差异显著,其中农大3号、丰优501和超产2号诱导率和致密率达到80%以上,表明其优良再生能力(图2)。

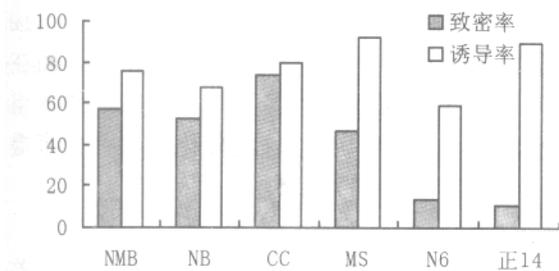


图1 不同培养基对农大19愈伤组织诱导的影响

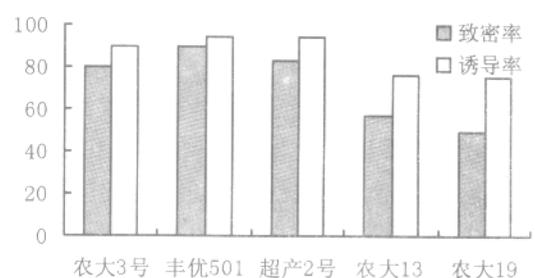


图2 不同基因型水稻愈伤组织诱导的差异

2.2.3 不同激素种类和浓度对愈伤组织诱导的影响

表2 不同激素种类和浓度对愈伤组织诱导的影响

激素处理 (mg/L)	接种数 (粒数)	愈伤组织 (块数)	致密愈伤组织 (块数)	愈伤组织诱导率 (%)	致密愈伤诱导率 (%)
1 NMB+2,4-D 0	80	0	0	0	0
2 NMB+2,4-D 1.0	80	76	62	95.00	77.50
3 NMB+2,4-D 2.0	72	62	48	86.11	66.67
4 NMB+2,4-D 3.0	99	60	24	60.61	24.24
5 NMB+2,4-D(1.0)+NAA(0.5)	74	51	25	68.92	33.78
6 NMB+2,4-D(1.0)+KT(0.5)	110	74	38	67.27	34.45
7 NMB+2,4-D(1.0)+NAA(0.5)+KT(0.5)	80	50	20	62.50	25.00

注:该数据为5个水稻品种的综合平均值。

在实验中采用 7 种激素处理, 研究不同激素处理条件下的诱导效果。结果表明, 处理 1 诱导率最低为 0, 其它 6 种激素处理诱导率均达到了 60% 以上, 但致密率差异显著。处理 2 最高为 77.5%, 处理 4 最低为 24.24%。其中表现比较好的诱导效果为处理 2 和 3, 即 2,4-D 浓度为 1.0 和 2.0 mg/L, 处理 2 的诱导率和致密率为 95.0% 和 77.5% (表 2)。

2.3 愈伤组织的继代培养

2.3.1 培养基种类对水稻愈伤组织继代培养的影响

用 6 种培养基对水稻愈伤组织进行继代培养, 不同的培养基继代效果差别显著。有大量的研究报道 NB 培养基主要用于南方籼稻组织培养, 本实验表明, NB 培养基也适用于北方粳稻的培养。不同的培养基其增重的指数排列顺序为: NMB>NB>CC>MS>正 14>N₆。其中 NMB 增重最快, 愈伤组织质量好, 为结构致密, 乳白色颗粒状, NB 为乳白色的颗粒状; CC 和 MS 愈伤组织状态较好, 结构致密, 为黄色; 正 14 为乳白色大块, 质地坚硬, 不容易剥落, 分化困难; N₆ 继代效果最差, 愈伤组织增重最慢, 且结构松散, 为黄色, 此类愈伤组织不能分化出苗 (图 3)。

2.3.2 渗透调节剂对愈伤组织继代的影响

在 NMB 培养基中添加 4 g/L 甘露醇, 愈伤组织增重效果明显, 比对照增重 2.625 6 倍; 当甘露醇的加入量为 8 g/L 时, 愈伤组织的增重指数下降, 且增重指数远远低于对照。这表明适当的加入甘露醇有利于愈伤组织的生长和繁殖, 过多的甘露醇会抑制愈伤组织的生长。所以愈伤组织在继代培养的过程中, 要根据愈伤组织的生长状态适量加入甘露醇 (图 4)。

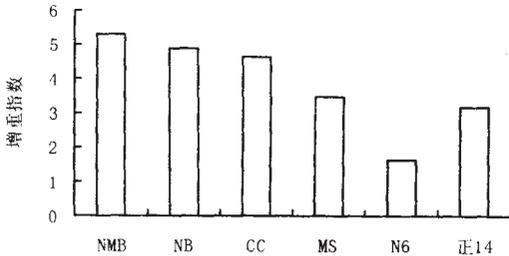


图 3 不同种类培养基对愈伤组织继代的影响

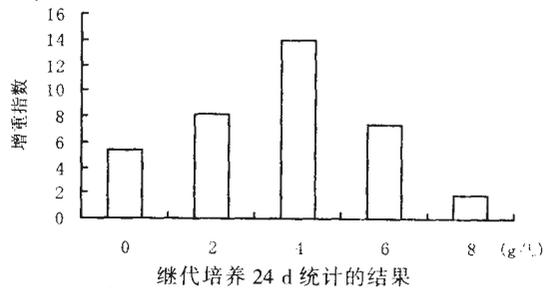


图 4 甘露醇对愈伤组织继代的影响

2.4 愈伤组织的分化

2.4.1 预分化培养对水稻愈伤组织分化率的影响

在水稻的组织培养过程中, 分化率低一直是制约水稻遗传转化的一个主要因素。粳稻品种的直接分化率平均低于 10%。关于粳稻分化前的预分化培养在水稻组织培养中的重要作用未见报道, 而在南方籼稻的分化再生中有过报道^[3]。实验结果表明, 通过 10~30 d 的预分化培养不但可以改变愈伤组织的生长状态, 而且可以显著提高愈伤组织的分化频率。水稻品种丰优 501 经过预分化培养分化率提高 8 倍多。由此, 水稻愈伤组织再生的过程中预分化的培养是必不可少的 (图 5)。

2.4.2 不同水稻品种的分化率

经过预分化, 不同基因型水稻的分化率都有大幅度的提高, 但是不同基因型的水稻品种分化率差异显著。其中水稻品种丰优 501 最高为 95.0%, 农大 19 最低为 35.0% (图 6)。

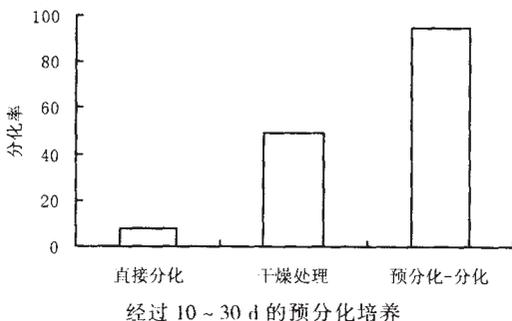


图 5 预分化在水稻分化中的作用

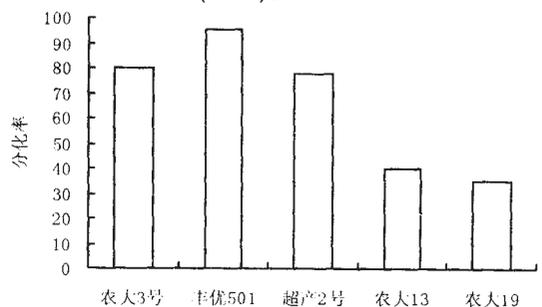


图 6 不同水稻品种的分化率

此外,在实验过程中发现的 0、5、10、15、20、25、30 d 的预分化 - 分化的过程中,随着预分化时间的延长,转移到分化培养基中愈伤组织的分化率呈“ ”型,这说明有一个最佳的预分化时间,并且各个品种所表现的最佳预分化时间是不同的。因此,在进行预分化时要根据愈伤组织的生长状态来确定预分化时间的长短。

3 讨 论

水稻品种间在愈伤组织再生能力上有很大差异,一个高效形成愈伤组织及再生植株的组织培养体系是细胞工程和基因工程在育种上运用的基础。有报道^[4],在玉米组织培养过程中,培养基中附加甘露醇和山梨醇等渗透调节剂有助于改善细胞质量。在本实验中,首次在继代培养基中添加甘露醇 4g/L 时,明显改善愈伤组织的质量。其机理可能是高渗处理造成愈伤组织的渗透胁迫,从而启动内在的调节系统,增强愈伤活力。然而,要从高层次上解决转基因受体不良培养特性的问题,还有赖于对细胞再生分化机理的进一步研究。

参考文献:

- [1] 颜昌敬,等. 水稻叶片愈伤组织的诱导植物再生的研究[J]. 科学通报, 1992, 10: 633-636.
- [2] 王景余,等. 水稻遗传转化研究进展[J]. 生物技术通报, 2002, (1): 20-25.
- [3] 田文忠. 提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 遗传学报, 1994, 21(3): 215-221.
- [4] 王 雷,等. 玉米自交系 7922 胚性愈伤组织的诱导条件的优化[J]. 玉米科学, 2002, 10(1): 18-20.

Factors Affecting the Frequencies of Callus Induction and Plantlet Regeneration in Mature Embryo Culture of Rice

HAO Wen-yuan¹, WANG Pi-wu², LIN Xiu-feng¹, et al.

(1. Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling, 136100;
2. Biology Center, Jilin Agricultural University, Changchun, 130118, China)

Abstract: Five rice genotypes were used to study the factors affecting callus induction and subsequent plantlet regeneration in mature embryo culture of rice. Highly efficient plantlet regeneration systems were established for tested varieties. The results were as follows: (1) Medium of NMB, NB and CC gained very well induction efficiency and excess 50 percent. (2) Induction medium which containing 2,4-D 1-2mg/L can obviously enhance the efficiency of induction. (3) D-Mannitol 4g/L can improve the state and height of calli. (4) Treatment of calli for pre-regeneration before differentiation could obviously increase plantlet regeneration.

Key words: *Oryza Sativa* L.; Mature embryo; High efficient; Regeneration system