

文章编号:1003-8701(2014)03-0005-04

利用水稻幼穗建立适合叶绿体转化的高频再生体系

王云鹏^{1,2}, 韦正乙², 张玉英^{1,2}, 邢少辰^{2*}, 马景勇^{1*}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

摘要: 良好的高频再生能力是水稻叶绿体转化能否成功的重要因素。本研究选择最新选育的 20 个具有良好农艺性状的早熟水稻新品系为材料, 分别剥取幼穗作为外植体, 从基因型和培养基组成两个因素对水稻再生体系进行优化, 筛选高频再生能力好的水稻品系。研究表明, 水稻品系 19 的幼穗在含有 2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上愈伤诱导率为 100%, 经过连续 8 轮继代后在最适培养基 SF3 上仍能保持 77.8% 的分化率, 且分化数多于 10 株的高频分化率为 36.1%, 具有作为叶绿体转化受体的潜力。

关键词: 水稻; 幼穗; 再生; 组织培养

中图分类号: Q785

文献标识码: A

Screening of High-Frequency Regeneration Lines Feasible for Chloroplast Transformation Using Young Panicle of Rice as Explant

WANG Yun-peng^{1,2}, WEI Zheng-yi², ZHANG Yu-ying^{1,2},
XING Shao-chen^{2*}, MA Jing-yong^{1*}

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The ability of high-frequency regeneration is the key factor for successful chloroplast transformation of rice. At the present study, twenty newly bred rice lines with early-maturing and good agronomic traits were used as explants to evaluate their regeneration ability by means of optimal design with three media and 20 lines, and finally screen out the lines with high-frequency regeneration ability. The results indicated that the callus induction frequency of line 19 reached up to 100% on the MS medium supplemented with 2.0 mg/L 2,4-D, and the callus differentiation rate kept 77.8% on SF3 medium after eight rounds of subculture continuously. More importantly, high-frequency differentiation rate of line 19 which means more than 10 plantlets were regenerated from one callus still remained 36.1%, and therefore it is considered to be the potential candidate for subsequently chloroplast transformation.

Keywords: *Oryza sativa*; Young panicle; Regeneration; Tissue culture

作为重要的粮食作物, 水稻是世界上三分之一人口的主食, 也是生物学研究中重要的模式植物。自 1955 年以藤原等^[1]开始水稻组织培养至今, 已经有许多报道利用水稻不同部位作为外植体成功诱导出愈伤组织并再生成苗, 包括花药^[2-3]、幼穗^[4-5]、

幼胚^[6-7]、成熟胚^[8-9]等。另外, 通过组织培养诱变技术选育水稻新品种^[10-11], 将外源基因转入水稻核基因组改良品种^[12-13]以及水稻 T-DNA 插入突变文库的建立^[14-15]等方面的研究也取得了明显进展。

叶绿体转化技术是一种新兴的植物遗传转化技术, 相对于传统的核转化, 具有明显的优势如表达量高、无基因沉默等^[16], 所以在作物遗传改良、植物生物反应器以及叶绿体发育等方面发挥重要作用^[17]。因此, 将叶绿体转化技术改良水稻重要农艺性状、增强抗性水平等方面的研究具有积极意

收稿日期 2013-12-25

作者简介: 王云鹏(1982-) 男, 在读博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者: 邢少辰 男 研究员, E-mail: xingsc@cjaas.com

马景勇 男 教授 E-mail: 99n2@163.com

义。然而,目前叶绿体转化绝大多数是经过基因枪轰击后,通过组织培养途径获得纯合转基因材料,所以叶绿体转化对组织培养和再生的要求比核转化更为苛刻,例如受体材料要具有高频的再生率,经过多轮筛选仍然保持较高的再生能力;或者愈伤组织经长时间的多次继代培养后,仍然具有较高再生能力。具备了这些基本特性的物种才有可能进行叶绿体遗传转化。尽管水稻组织培养技术经多年实践已较为成熟,但是仍然存在不少问题无法克服,如不同基因型之间的再生能力差异显著^[18-19]和长期继代导致再生能力明显下降^[20-21]等,这也是目前水稻叶绿体转化研究进展缓慢的重要原因。关于水稻叶绿体转化的报道,目前只有两篇文献,均未获得同质化的转基因材料^[22-23]。

本研究利用具有良好农艺性状的水稻新品系的孕穗作为外植体,从基因型和植物激素组成等方面着手,在优化水稻再生体系的基础上,筛选出长期多次继代后仍能保持较好再生能力的水稻基因型,为今后的水稻叶绿体转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试的试验材料为 20 份早熟水稻品系(表 1),由吉林农业大学水稻育种实验室选育。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻幼穗愈伤组织的诱导

在水稻进入孕穗期后,将水稻茎秆拔出,用 75%酒精擦拭表面灭菌,在超净台中直接用镊子取出幼穗,选取长度为 8~15 mm 的幼穗,将整根幼穗切割成长度约 3~5 mm 的小段,接种于含有 2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,每个培养皿放 9 个外植体,设置 4 次重复。置于恒温培养室培养,培养条件为温度 26℃,光照强度为 1 500~2 000 lx,16 h 光照 8 h 黑暗。培养 20 d 后观察愈伤诱导

情况,计算诱导率(诱导率 = 诱导愈伤组织外植体数 / 接种外植体数),鉴别愈伤组织的类型。

1.2.2 愈伤组织的分化

取直径约为 5 mm 的 II 型水稻愈伤组织,分别置于分化培养基 SF1 (N6 盐 + B5 有机 + 1 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L NAA + 0.2 mg/L ZT + 0.5 mg/L KT + 3%蔗糖)、SF2 (N6 大量 + MS 微量 + B5 有机 + 3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 3%蔗糖)和 SF3 (MS 盐 + B5 有机 + 1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT + 3%蔗糖)上进行分化培养,20 d 后统计出现绿色不定芽愈伤的块数,计算分化率(分化率 = 分化的愈伤组织块数 / 接种愈伤组织块数)。再经过 10~20 d 的培养,统计每块愈伤组织上分化的不定芽数量,记录分化出 10 个以上不定芽的愈伤组织数量,计算高频分化率(高频分化率 = 能分化多于 10 个不定芽的愈伤组织块数 / 接种愈伤组织块数)。

1.2.3 愈伤组织的多轮继代与分化率

将编号为 19、58 和 808 的 3 个品系的愈伤组织放置在 2.0 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,每隔 20 d 左右继代一次,连续继代 10 次,然后分别置于最适的分化培养基上分化培养 40 d,照相记录,分析多轮继代培养对其分化的影响,统计分化率和高频分化率。

1.2.4 再生植株的生根与移栽

将水稻品系 19 的愈伤组织连续继代 10 次后分化出的再生植株移至 MS 培养基上进行生根培养,直至幼苗长到 10 cm 高后,打开培养瓶盖子,室温炼苗 3 d 后,移栽至含有 30%蛭石的腐殖土中培养。

2 结果与分析

2.1 水稻不同基因型的愈伤组织诱导率

以 20 个水稻早熟品系为材料,叶鞘灭菌后直接取幼穗按照前述方法放置在诱导培养基上培养,

表 1 水稻不同基因型的愈伤组织诱导率

品系	接种数	愈伤数	诱导率(%)	愈伤类型	品系	接种数	愈伤数	诱导率(%)	愈伤类型
12	36	21	58.3	III	117	36	0	94.4	ND*
14-17	36	33	91.7	I	198	36	33	91.7	I
15	36	27	75.0	III	201	36	34	94.4	I
17	36	35	97.2	II	239	36	35	97.2	II
19	36	36	100	II	450	36	22	61.1	III
35	36	0	0	ND	501	36	33	91.7	II
37-14	36	22	61.1	II	808	36	35	97.2	II
47	36	34	94.4	I	848	36	25	69.4	III
58	36	36	100	II	1 471	36	0	0	ND
111	36	36	100	I	2291	36	33	91.7	III

注 ND 未检测

统计愈伤诱导的结果。由于幼穗的部位特殊性,无需采用传统的升汞、次氯酸钠和过氧化氢等方法对幼穗进行灭菌即可达到无菌的要求。统计结果表明(表 1),除了水稻品系 35、117 和 1 471 未能诱

导出愈伤组织外,其余品系的诱导率均大于 50%,有 10 个品系的出愈率大于 90%,但是其中仅有 17、19、58、239、501 和 808 的愈伤组织主要为 II 型愈伤(图 1),故选择这几个品系继续进行下一步实验。

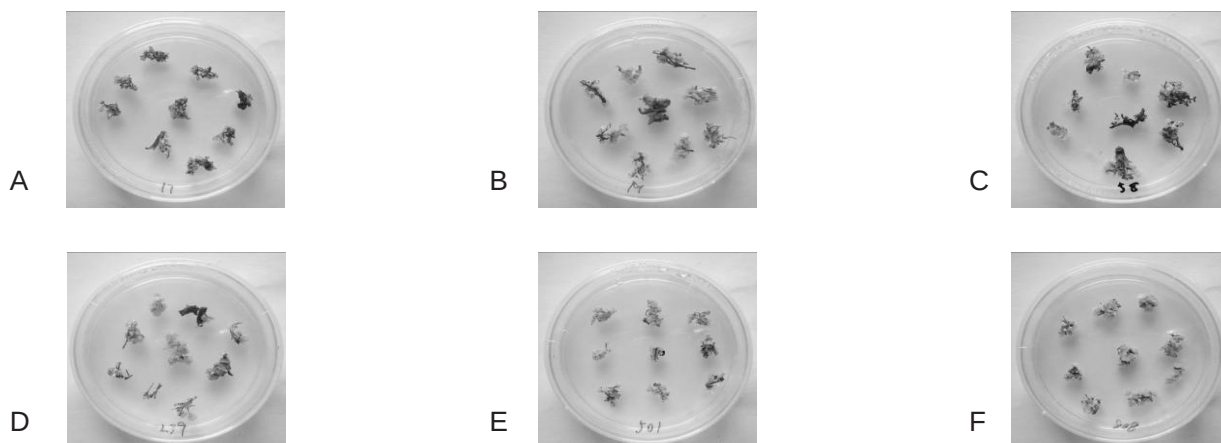


图 1 可高频诱导 II 型愈伤组织的水稻基因型

A-F :依次为水稻品系 17、19、58、239、501 和 808

2.2 愈伤组织的分化

将上述 6 种基因型诱导的 II 型愈伤组织块移至 3 种不同的分化培养基上分化培养,结果如图 2 所示。3 种不同培养基对 6 种基因型水稻愈伤组织的分化再生影响各异,其中品系 808 的最适分化培养基为 SF1,品系 17、58、239 和 501 的

最适分化培养基均为 SF2,而品系 19 最适分化培养基则为 SF3。其中 19、58 和 808 3 个品系在各自最适培养基上的高频分化率均在 70%以上,具备作为叶绿体转化受体的潜力。同时,选择此 3 个品系进行下一步的多轮继代并分析其再生能力。

2.3 继代次数对愈伤组织再生的影响



图 2 不同培养基对分化的影响

A :分化率;B :高频分化率

本试验表明,经多次继代培养后,愈伤组织的分化能力明显下降。水稻品系 808 的愈伤组织经连续继代 8 次后,在其最适分化培养基 SF1 上的分化率为 48.7%(图 3A)。全部 56 块愈伤组织中仅

有 2 块分化出了 10 株以上的再生植株,高频分化率为 3.6%,且出现了较多的白化苗,因此该品系不适合多次继代;水稻品系 58(图 3B)在最适分化培养基 SF2 上再生的愈伤组织均可分化出 10 株



图 3 多轮继代对愈伤组织再生能力的影响

A :品系 808 ;B :品系 58 ;C :品系 19

以上的再生植株,但由于分化率下降严重,仅为14.7%,同样也不适合多轮继代试验;水稻品系19(图3C)在最适分化培养基SF3上的分化率为77.8%,高频分化率为36.1%,分化率和分化频次都是叶绿体转化过程中高压多轮筛选所必备的基本条件,是今后水稻叶绿体转基因研究潜在的受体材料。

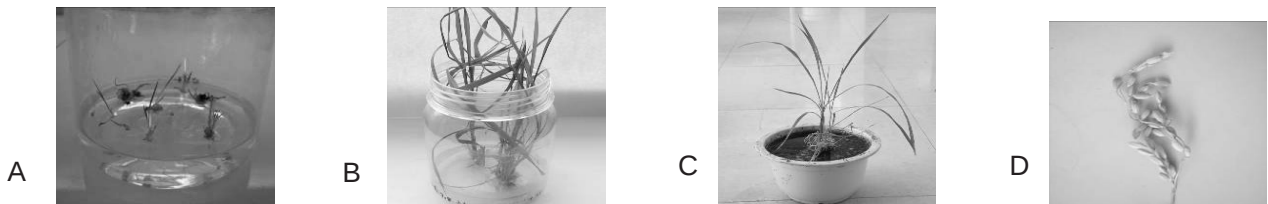


图4 水稻品系19再生植株的生根与移栽结实

A:生根;B:炼苗;D:移栽;E:结实

3 讨论

一般来说,建立水稻再生体系时,研究者往往会选择中花11、日本晴等模式基因型,或已推广种植的水稻品种作为目标材料^[24-25]。但如果受体自身的农艺性状不能满足农业生产的要求,利用基因工程技术引入新的功能基因后,无法直接推广应用,而需要进行回交转育,延长了育种周期,不利于转基因新品种的培育。本研究中筛选出的高频再生水稻品系,均是在品种选育过程获得的综合农艺性状优良的中间材料,有望进一步成为苗头品种。因此,这些品系材料再生体系的建立会明显缩短转基因水稻品种培育的周期。

Lee等^[22]分析水稻叶绿体转化出现的困难时明确指出,受体材料经过长期继代后再生能力下降是阻碍同质化进程的主要原因。目前建立的用于核转化的水稻再生体系基本选取较短的培养、筛选和继代时间,以避免长期连续的继代培养所产生的愈伤组织再生率低、白化苗、体细胞突变等问题^[26-27]。我们知道,获得叶绿体转化同质化纯合材料的主要途径是高压多轮筛选^[16-17]。因此,本研究中尽管包括品系17在内的所有水稻基因型都能满足核转化的需要,但是大多数却无法绿叶体转化的需要。只有水稻品系19幼穗所诱导出的愈伤组织经过连续10次,每次20d的长期连续继代后,仍能在分化培养基SF3上具有很好的高频分化率,是今后进行水稻叶绿体转化研究的一份理想候选材料。

参考文献:

[1] 藤原彰夫. 緑色植物に於ける微量要素の生化学(第2報): 水稻及び大麥鉄欠乏症状の発現及び回復に伴う主要成分の変遷[J]. 日本土壤肥料学会講演要旨集, 1955(1): 8.

2.4 再生植株的生根与移栽

将水稻品系19的分化植株移至不含任何激素的MS培养基上,培养10d左右可以生根(图4A),再经过20d左右的培养植株长至10cm,经过炼苗后(图4B),移栽到土壤中(图4C),再生植株能够正常生长并结实(图4D)。

[2] 张桂莲,张顺堂,肖浪涛,等. 花期高温胁迫对水稻花药生理特性及花粉性状的影响[J]. 作物学报, 2013, 39(1): 177-183.

[3] Serrat X, Cardona M, Gil J, et al. A Mediterranean japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar improvement through anther culture[J]. Euphytica, 2014, 195(1): 31-44.

[4] 王亚琴,段中岗,黄江康,等. 水稻幼穗培养高效再生系统的建立[J]. 植物学通报, 2004, 21(1): 52-60.

[5] 王闯霞,张志勇,白玉路,等. 高效诱导及再生能力粳型水稻品系的筛选[J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 6-9.

[6] 高振宇,黄大年. 影响水稻幼胚愈伤组织形成和植株再生的若干因素[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 113-115.

[7] 许惠滨,魏毅东,连玲,等. 根癌农杆菌介导水稻高效遗传转化体系的构建[J]. 福建农业学报, 2012, 27(5): 475-480.

[8] 王满,李霞,石牡丹,等. 转玉米C4型pepc水稻成熟胚为外植体的水稻悬浮细胞系的优化[J]. 分子植物育种, 2012, 10(6): 644-654.

[9] 王北艳,向殿军,殷奎德. 提高粳稻成熟胚抗性愈伤再生频率的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2012, 24(1): 28-31.

[10] 周晓昱,丁玉梅,孙茂林,等. 24个水稻抗稻瘟病单基因鉴别品系悬浮细胞系的建立[J]. 西南农业学报, 2008, 21(3): 642-647.

[11] 张春燕,周明国,王建新,等. 利用细胞和组织培养技术研究水稻抗稻瘟病机制[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(4): 53-60.

[12] 王康君,熊溢伟,葛立立,等. 籽粒蛋白质含量不同的转基因水稻株系产量形成特点[J]. 作物学报, 2013, 39(7): 1266-1275.

[13] 刘志钦,马小玲,严雁,等. 拟南芥AtLURP1基因启动子在转基因烟草和水稻中的功能分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(2): 308-313.

[14] 岳彬彬,刘序章. 湖北光周期敏感核不育水稻DNA文库的构建[J]. 华中农业大学学报, 1990, 9(4): 479-480.

[15] 韩小霞. 水稻候选抗病基因文库构建及功能验证[D]. 中南大学, 2012.

[16] Grevich J J, Daniell H. Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2005, 24(2): 83-107.

[17] Daniell H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops[J]. Nature biotechnology, 2002, 20(6): 581-586.

(下转第17页)

- 缓解效应[J]. 水土保持学报, 2005, 19(3): 101-104.
- [2] 杨利艳, 杨武德. 21 世纪的作物名星 - 荞麦[J]. 世界农业, 2002(1): 36.
- [3] 乔慧萍, 李建设, 雍立华, 等. 植物盐胁迫生理及其适应性调控机制的研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2007(3): 34-36.
- [4] 斯琴巴特尔, 吴红英. 盐胁迫对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2000, 14(4): 76-80.
- [5] 苏 实, 练薇薇, 杨文杰, 等. 盐胁迫对番茄种子萌发和幼苗生长的效应[J]. 华北农学报, 2006, 21(5): 24-27.
- [6] Munns R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses[J]. Plant, Cell and Environment, 1993, 16(1): 15-24.
- [7] Francois L E, Maas E V, Donovan T J, et al. Effect of salinity on grain yield and quality, vegetative growth and germination of semidwarf and durum wheat [J]. Agronomy Journal, 1986, 78 (6): 1053-1058.
- [8] 战伟龔, 邱念伟, 赵方贵, 等. 盐和水胁迫对不同荞麦品种生理特性的影响[J]. 中国农学通报, 2009, 25(17): 129-132.
- [9] 战伟龔, 张学杰, 杨德翠, 等. NaCl 和等渗 PEG 对荞麦 SOD 及 APX 活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 101-102.
- [10] 侯福林. 植物生理学实验教程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 49-50.
- [11] 李锦树, 王洪春, 王文英, 等. 干旱对玉米叶片细胞膜透性及膜脂的影响[J]. 植物生理学报, 1983, 9(3): 223-229.
- [12] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605-615.
- [13] 李文卿, 潘廷国, 柯玉琴, 等. 土壤水分胁迫对甘薯苗期活性氧代谢的影响[J]. 福建农业学报, 2000, 15(4): 45-50.
- [14] 斯琴巴特尔, 吴红英. 不同逆境对玉米幼苗根系活力及硝酸还原酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2001, 19(2): 67-70.
- [15] 刘海龙, 郑桂珍, 关军锋, 等. 干旱胁迫下玉米根系活力和膜透性的变化[J]. 华北农学报, 2002, 17(2): 20-22.
- [16] 苗海霞, 孙明高, 夏 阳, 等. 盐胁迫对苦楝根系活力的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005, 36(1): 9-12.
- [17] 朱晓军, 杨劲松, 梁永超, 等. 盐胁迫下钙对水稻幼苗光合作用及相关生理特性的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1497-1503.
- [18] Kalir A, Poljakoff-Mayber A. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* (L.) aellen exposed to high sodium chloride concentrations[J]. Annals of Botany, 1981, 47 (1): 75-85.
- [19] Takahama U, Oniki T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells [J]. Physiologia Plantarum, 1997(101): 845-852.
- [20] 吴晶晶, 朱月林, 张古文, 等. NaCl 胁迫对结荚期毛豆叶片抗氧化酶活性和脯氨酸含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2008 (2): 135-137.
- [21] 马纯艳, 李玥莹. 不同玉米品种的抗盐性及其分子标记的比较研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(2): 123-126, 132.
- [22] 杨洪兵. NaCl 胁迫和等渗 PEG 处理对小麦 APX 活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 151-152.

(上接第 8 页)

- [18] 赵海岩, 郑文静, 王德兴, 等. 水稻抗稻瘟病突变体离体筛选及在育种中应用[J]. 辽宁农业科学, 2001(3): 21-25.
- [19] 李 楠, 陈巧玲, 李亚娟, 等. 抗稻瘟病细胞突变体筛选技术的研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(18): 233-236.
- [20] 陈 璋, 朱秀英. 水稻愈伤组织继代培养中游离氨基酸库的变化与再分化的相关[J]. 作物学报, 1993, 19(4): 334-341.
- [21] 周玲艳, 秦华明, 谢俊平, 等. 提高水稻愈伤组织再生频率的研究[J]. 种子, 2006, 25(7): 28-31.
- [22] Khan M S, Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants[J]. Nature biotechnology, 1999, 17(9): 910-915.
- [23] Lee S M, Kang K, Chung H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny[J]. Molecules and cells, 2006, 21(3): 401.
- [24] 赵宏伟, 宋彦超. 寒地粳稻再生体系的优化研究[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 32-38.
- [25] 王敬东, 马洪爱, 马洪文, 等. 宁夏优质水稻品种 D10 高效再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 37-42.
- [26] Slamet -Loedin I H, Chadha -Mohanty P, Torrizo L. Agrobacterium-Mediated Transformation: Rice Transformation [M]//Cereal Genomics. Humana Press, 2014: 261-271.
- [27] Duan Y, Zhai C, Li H, et al. An efficient and high-throughput protocol for Agrobacterium-mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant cell reports, 2012, 31(9): 1611-1624.