

杂交籼稻亲本成熟胚组培研究

沈显华, 黄仁良, 朱珊 (江西省农业科学院水稻研究所, 江西南昌 330200)

摘要 由于水稻组培效率对基因型的依赖性较强, 因此针对水稻基因型研究和建立其高效组培技术体系尤为重要。筛选了愈伤诱导基本培养基, 比较了 6-BA 和 Kt 对植株分化的效果, 优化了激素配比。结果表明: 16 个基因型在愈伤诱导培养基 MS 上, 平均愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率分别为 83.47%、38.59%, 较 CC 培养基分别高出 3.40% 和 7.42%; 16 个基因型中有 12 个基因型在 MS 培养基中表现出更高的胚性愈伤诱导率, 且出愈时间早、愈伤生长快, 不易褐化, 说明 MS 培养基可作为杂交籼稻亲本成熟胚愈伤诱导的广谱培养基; 植株分化预备试验结果显示, 6 个基因型在附加 6-BA 的分化培养基中均表现出更高的绿苗分化率, 平均较使用 Kt 提高了 10.65%, 说明 6-BA 较 Kt 用于植株分化可取得更好效果; 正交试验优化植株分化激素配比的试验结果表明 R998 和 R463 的最优激素组合均为 3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L Kt, 而 R253 和 R402 的最优激素组合分别为 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA、2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L Kt, 说明通过优化分化培养基中的激素配比, 可以进一步提高了籼稻绿苗分化率, 尤其是对于植株再生培养力低的基因型极为有效。

关键词 杂交籼稻; 亲本; 成熟胚; 愈伤诱导; 胚性愈伤; 正交试验; 激素; 植株分化

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)25-10776-03

Studies on Enhancement of Tissue-culture Efficiency in Mature Embryo of Parental Lines of Indica Hybrid Rice

SHEN Xian-hua et al (Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200)

Abstract Tissue culture efficiency of rice was highly dependent on the genotypes. It was of great paramount to study and set up an efficient tissue culture system focused on the particular genotypes of rice. The research screened more suitable callus induction medium, compared the effectiveness of 6-BA and Kt in the plant regeneration, and optimized the combinations and concentrations of plant growth hormones in plant regeneration medium. The results showed that the average CIR and ECIR obtained on MS medium were 83.47% and 38.59%, respectively, being 3.4% and 7.42% higher than on CC medium, and among the 16 tested genotypes, 12 had simultaneously higher CIR and ECIR on MS than on CC. In addition, earlier response and more rapid growth of calli with lower rate of necrosis were observed on MS. Therefore, it indicated that MS medium had a broader spectrum in terms of callus induction from mature embryos of the indica hybrid rice parental lines. Comparison of the effectiveness of 6-BA and Kt showed that all of the 6 tested restorer lines displayed a higher GPRR on the medium consisting of 6-BA than that of Kt, and on average, the GPRR was 10.65% higher compared to the use of Kt. Hence, it was preliminarily concluded that 6-BA had a better effectiveness than Kt for plant regeneration in indica hybrid rice. The orthogonal test showed that the optimal combination and concentration of hormones for 2 genotypes, such as R998 and R463, were 3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L Kt, while the optimal combination and concentration of hormones for R253 and R402 were 1 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA and 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L Kt, respectively. In general, the orthogonal test with the hormones obtained very significant results in increasing the green plant regeneration rates of rice genotypes. Therefore, it was indicated that optimization of combinations and concentrations of hormones could further increase the GPRR of indica genotypes, especially, of those recalcitrant genotypes of indica rice.

Key words Indica hybrid rice; Parental lines; Mature embryo; Callus induction; Embryogenic callus; Orthogonal test; Plant growth hormones; Plant regeneration

遗传转化已成为水稻基因功能研究以及遗传改良的一种有效手段, 而建立高效水稻组培体系是实现水稻高效遗传转化的基础。一般而言, 籼稻 (*Oryza sativa* L. ssp. indica) 遗传转化相对困难, 主要原因是籼稻愈伤组织诱导尤其是植株再生较为困难, 且对组培和转化反应的基因型依赖性强, 增大了遗传转化的复杂性和随机性。影响籼稻植株组培效率的因素有很多, 其中关键因素主要有水稻基因型、外植体种类及其生长状态、培养基类型、激素配比等^[1-4]。一般认为, 成熟胚诱导效率不高, 继代易褐化、胚性不好^[5], 尤以籼稻更甚。然而, 由于成熟胚具有取材不受季节限制、操作简便、可持续提供转化受体等特点而倍受青睐。因此, 提高以成熟胚为外植体的籼稻组培效率、建立高效组培体系, 使其在基因工程中得到更广泛的应用, 有着十分重要的意义。目前用于籼稻组培的培养基主要有 MS、NB 和 CC 培养基^[6], 但针对杂交籼稻亲本究竟哪一种培养基具有更好的广谱性仍不明确。为了提高籼稻基因型植株分化能力, 许多学者研究了激素及其比对籼稻组培植株分化率的影响^[7-9], 但利用多因素多水平正交试验来优化激素配比的报道不多。笔者建立了以

成熟胚为外植体的杂交籼稻亲本高效组培体系, 为杂交籼稻亲本高效转基因技术体系奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 水稻品种 所用水稻品种共 16 个, 包括 R725、R128、9311、R998、R752、R402、桂 99、BR207、SI22、R463、R253、明恢 86、明恢 63 和 R527 等 14 个恢复系以及珍汕 97B、C4B 等 2 个保持系。

1.2 愈伤组织诱导 选用 CC 和 MS 培养基作为愈伤诱导基本培养基, 分别附加 500 mg/L 谷氨酰胺、300 mg/L 水解酪蛋白、30 g/L 蔗糖、2 mg/L 2,4-D 和 0.2 mg/L Kt, 调 pH 值至 5.8 后用 8 g/L 琼脂固化。用浓度 70% 乙醇浸泡去壳后的水稻种子 1 min, 再用浓度 2% 次氯酸钠溶液浸泡 30~40 min, 无菌水漂洗 4~5 次后置于无菌滤纸上以吸收多余水分, 然后接种于愈伤诱导培养基, 于 (25±1)℃ 条件下暗培养。每个品种分别在 CC 和 MS 培养基上接种 20 瓶, 每瓶 10 粒种子。10 d 后, 观察并记录出愈情况。

愈伤诱导率 = 愈伤数 / 发芽种子数 × 100% (1)

胚性愈伤诱导率 = 胚性愈伤数 / 发芽种子数 × 100% (2)

1.3 植株分化 在植株分化培养预备试验中, 培养基基本成分为 MS 大量、MS 微量、N6 有机、300 mg/L CH、500 mg/L 谷氨酰胺和 30 g/L 蔗糖。在分别附加 6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 和 KT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 后, 分别命名为 MSB 和 MSK。调 pH 值至 5.8 后, 用 8 g/L 琼脂固化。10 d 胚性初始

基金项目 江西省学科带头人培养项目; 江西省农业科学院创新基金项目。

作者简介 沈显华 (1962-), 男, 江西湖口人, 研究员, 从事水稻分子育种方面的研究。

收稿日期 2008-06-25

愈伤分别接种于2种植株分化培养基上,于 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,光暗周期为16 h/8 h。培养4周后,统计绿苗分化率。

绿苗诱导率 = 产生绿苗愈伤数/接种愈伤数 $\times 100\%$ (3)

为提高基因型绿苗分化率,以与上述同样的基本培养基(激素除外),对6-BA、NAA和Kt3种激素,设计了3因素3水平正交试验。其中,6-BA设1、2和3 mg/L 3个水平,NAA和KT均设0.05和1.0 mg/L 3个水平。试验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计(表1),共9个处理,设3次重复。每个基因型每个处理每个重复接种4~5瓶,每瓶接种胚性愈伤5~6块。试验数据经反正旋转换后,采用DPS软件进行统计分析。

表1 激素3因素3水平正交试验

Table 1 The orthogonal test of hormones with three factors and three levels

序号 Serial number	因素 Factor		
	6-BA(A)	NAA(B)	Kt(C)
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

2 结果与分析

2.1 不同基因型在不同培养基上愈伤组织诱导频率 由表2可知,MS培养基平均愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率分别为83.47%、38.59%,较CC培养基分别高出3.40%和7.42%。

表2 16个基因型在2种愈伤培养基的愈伤诱导情况

Table 2 The callus induction of 16 genotypes on 2 kinds of callus media

基因型 Genotype	愈伤诱导率 Callus induction rate		胚性愈伤诱导率 Embryogenic callus induction rate	
	CC	MS	CC	MS
R725	82.00	65.28	52.00	37.50
R128	85.00	76.00	22.50	56.00
9311	71.43	86.79	1.79	11.32
R998	84.00	72.41	40.00	44.83
R752	85.07	84.00	58.21	64.00
R402	79.41	65.96	11.76	19.15
桂99 Gui 99	69.23	85.71	23.08	61.90
BR207	71.26	79.25	40.23	42.45
R122	55.26	89.53	21.05	34.88
R463	91.67	82.56	22.73	6.98
R253	88.16	88.68	51.32	66.04
明恢86 Minghui 86	80.77	86.49	50.00	51.35
明恢63 Minghui 63	74.47	90.57	38.30	49.06
R527	90.91	100.00	27.27	5.26
珍B Zhen B	88.57	100.00	14.29	43.33
C4B	83.91	82.22	24.14	23.33

16个基因型中有12个基因型在MS培养基中表现出更高的胚性愈伤诱导率,且出愈时间早、愈伤生长快,不易褐化。这说明在参试的基因型中,MS培养基较CC培养基更适合于杂交水稻亲本成熟胚的愈伤诱导培养。另一方面,16个基因型在2个培养基的平均愈伤诱导率和胚性愈伤诱导率分别为

81.77%、34.88%,变幅分别为72.40%~95.46%、6.56%~61.11%,基因型间差异很大。这表明基因型是影响愈伤诱导的主要因素。

2.2 基因型、分化培养基对植株分化率的影响 为了初步筛选较好的植株再生培养基激素配比,以6个杂交水稻恢复系进行了植株再生培养预备试验。由表3可知,6个基因型在附加6-BA的分化培养基(MSB)中均表现出更高的绿苗分化率,平均较附加Kt的分化培养基(MSK)提高了10.65%,说明6-BA用于植株分化可取得更好的效果;另一方面,6个基因型的平均绿苗分化率为19.97%,变幅为5.24%~38.67%,差异很大,表明基因型也是影响出绿苗分化的主要因素。

表3 6个水稻基因型在再生培养基MSB、MSK的绿苗分化情况

Table 3 Green plantlet differentiation of 6 genotypes in hsien rice on the re-generation media of MSB and MSK

基因型 Genotype	绿苗分化率 Green plantlet differentiation rate	
	MSB	MSK
R998	6.89	3.59
R752	30.00	7.94
明恢86 Minghui 86	29.17	25.00
R402	47.50	29.84
R463	18.18	11.25
R253	20.00	10.24

2.3 植株分化培养激素组合和配比优化对绿苗分化率的影响 为进一步提高基因型绿苗分化率,优化适合各基因型植株分化培养的激素组合和配比,对6-BA、NAA、Kt进行了3因素3水平植株再生正交试验。参试的基因型为1个具有较高植株分化率的恢复系R402和3个具有较低植株分化率的恢复系R998、R253和R463。试验结果因篇幅有限未列出。对各基因型试验结果,利用DPS软件进行极差分析。极差分析结果表明,基因型R998和R463 3因素最优水平组合均为 $A_3B_2C_3$,即3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L Kt;基因型R253最优水平组合为 $A_1B_3C_1$,即1 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA;基因型R402最优水平组合为 $A_2B_1C_2$,即2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L Kt。

总体而言,激素3因素3水平的植株分化正交试验取得了极为明显的效果。基因型R998在植株分化预备试验(2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA,下同)的绿苗分化率仅为6.89%,而正交试验中处理⑤(2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L Kt)获得了最高的绿苗分化率,平均为48.72%,较预备试验提高了6倍之多;基因型R253在植株分化预备试验的绿苗分化率为20%,而正交试验中处理③(1 mg/L 6-BA + 1.0 mg NAA + 1.0 mg/L Kt)获得了最高的绿苗分化率,平均为41.22%,较预备试验提高1倍之多;基因型R402在植株分化预备试验的绿苗分化率为47.5%,而正交试验中处理④(2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L Kt)获得了最高的绿苗分化率,平均为97.62%,较预备试验也提高了1倍之多;基因型R463在植株分化预备试验的绿苗分化率仅为18.18%,而正交试验中处理⑤(2 mg/L 6-BA + 0.5 mg NAA + 1.0 mg/L Kt)获得了最高的绿苗分化率,平均为82.74%,较预备试验提高了3倍之多。若与正交试验所获的最优处理相比,则所有基因型绿苗分化率可提高更多。

3 讨论

水稻愈伤组织诱导和再生频率是决定能否成功转化的重要因素。尤其是籼稻品种,由于其再生能力普遍偏低,极大地影响了遗传转化在籼稻上的应用。试验结果表明,各品种的愈伤诱导率、胚性愈伤诱导率和绿苗分化率差异很大,说明基因型也是影响杂交籼稻亲本以成熟胚为外植体的组培效率的重要因素。培养基类型对籼稻组培愈伤诱导有着十分重要的影响。笔者研究了 16 个杂交籼稻亲本(恢复系和保持系)成熟胚在 MS 和 CC 培养基中的愈伤诱导情况。结果表明,MS 较 CC 培养基有着更好的广谱适应性。为了提高籼稻基因型植株分化能力,许多学者研究了激素及其配比对籼稻组培植株分化率的影响。王兴春等研究表明,6-BA 与 NAA 的配合使用较 Kt 与 NAA 的配合使用效果更好^[7]。Rachmawati 等对难以组织培养的爪哇稻品种 Rojolele 进行愈伤组织分化率诱导,发现以 2 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA 的激素配比植株再生频率最高^[8]。这与该研究结果相似,即 6-BA 用于植株分化可取得更好的效果。张平等报道了以 2 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L Kt 的激素配比,其愈伤组织的分化率最高^[9]。在对 4 个基因型进行 6-BA、NAA 和 Kt 3 因素 3 水平植株分化培养试验时,发现不同基因型所需的最优激素配比不同。籼稻基因型间植株再生能力存在差异有多方面的原因,其中植物内源激素成分和浓度是重要原因。罗琼等研究表明,对于内源激动素与内源生长素比低的籼稻基

因型,通过增加分化培养基中外源激动素浓度可以提高植株分化率^[10]。该研究通过优化分化培养基中的激素配比,进一步提高了籼稻绿苗分化率,尤其是对于植株再生培养力低的基因型极为有效。对植株分化力低的基因型 R998 和 R463 进行的激素优化结果显示,通过提高培养基(外源)激动素浓度水平(3 mg/L 6-BA + 1 mg/L Kt,结合 0.5 mg/L NAA),有效地提高了植株分化率。

参考文献

- [1] 田文忠, IANN RANCE, ELUNIALAI SIVAMANI, 等. 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.
- [2] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻愈伤组织形成和植株再生能力的因素[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 227 - 230.
- [3] 何琼英, 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.
- [4] 孙宗修, 斯华敏, 程式华, 等. 麦芽糖提高水稻花药培养效率的研究[J]. 中国水稻科学, 1993, 7(4): 227 - 231.
- [5] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化体系的建立[J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259 - 271.
- [6] 肖向文, 李苹, 杨正林, 等. 5 个骨干籼型恢复系再生能力的比较研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(3): 278 - 281.
- [7] 王兴春, 方红明, 徐惠兰, 等. 提高籼稻优质米品种成熟胚培养力的研究[J]. 种子, 2001(1): 26-27.
- [8] RACHMAWATI DIAH, TAKEHIKO HOSAKA, EIICHI INOUE, et al. *Agrobacterium-mediated transformation of javanica rice cv. Rojolele*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2004, 68(6): 1193 - 1200.
- [9] 张平, 左思敏, 李爱宏, 等. 提高农杆菌转化水稻频率几个因素的研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(1): 11 - 15.
- [10] 罗琼, 胡延玉, 周开达. 内源激素对水稻成熟胚培养力的影响[J]. 中国水稻科学, 1998, 12(4): 238 - 240.

(上接第 10751 页)

表 2 4 种荔枝花粉中游离氨基酸含量比较

Table 2 The content comparison of free amino acids in 4 kinds of litchi pollens

氨基酸	桂味	妃子笑	黑叶	淮枝
Amino acids	Guiwei	Feizixiao	Heiye	Huaizhi
Asp	20.7	7.4	9.2	13.7
Glu	14.2	9.8	15.2	22.4
Ser	13.1	3.7	6.1	8.8
His	1.6	18.0	33.4	45.7
Gly	23.6	4.1	14.3	21.2
Thr	2.2	0.8	1.5	2.6
Ala	18.1	5.0	11.1	17.1
Arg	16.0	12.3	13.3	5.3
Tyr	10.2	8.7	6.9	4.6
Cys-Cys	1.6	1.8	1.5	1.2
Val	9.1	7.0	5.9	5.6
Met	5.7	4.8	3.3	1.3
Phe	14.3	10.7	8.6	5.3
Ile	13.6	10.7	9.4	1.6
Lys	46.5	41.0	30.5	25.7
Leu	35.5	28.8	23.1	9.1
Pro	2.1	7.1	6.7	9.7
总含量 Total content	268.8	189.1	209.2	214.6

高,占总游离氨基酸的 46.98%;妃子笑以 His、Arg、Lys 和

Leu 含量最高,占总游离氨基酸的 52.93%;黑叶以 Glu、His、Lys 和 Leu 含量最高,占总游离氨基酸的 48.85%;淮枝以 Glu、His、Gly、和 Lys 含量较高,占总游离氨基酸的 53.59%。妃子笑的总游离氨基酸含量偏低,可能与花粉成熟度和树龄有关。

3 结论与讨论

(1)pH 值对分析测试有影响。该试验中,流动相的最佳 pH 值为 7.200 ± 0.025 , pH 值小于 7.100 氨基酸出峰不完全, pH 值增大色谱峰出峰时间提前,尤其是 10 ~ 16 min 出峰的氨基酸提前明显;OPA 衍生化反应的 pH 值要大于 8.500,而 FMOC 衍生化反应的 pH 值必须大于 9.500。

(2)该试验中,衍生化反应 2 min 内完成,18 种氨基酸在 22 min 内出峰完全且分离良好,溶剂峰(22 min 之后出峰)不影响检测,是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

(3)4 个荔枝品种花粉的总游离氨基酸含量从大到小排序为:桂味 268.8 mg/g > 淮枝 214.6 mg/g、黑叶 209.2 mg/g > 妃子笑 189.1 mg/g。

参考文献

- [1] 郭芳彬. 花粉的神奇妙用[M]. 北京:中国农业出版社, 2006: 7 - 8, 26 - 72.
- [2] 佚名. 荔枝[EB/OL]. (2003-11-13)[2008-06-24] <http://www.jibaoping.com/ShowArticle.asp?ArticleID=177&ArticlePage=1>.
- [3] 傅亮, 倪冬姣. 氨基酸高效液相色谱分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2): 77.