维普资讯 http://www.cqvip.com

第33卷第5期 湖南农业大学学报(自然科学版) Vol.33 No.5
2007年10月 Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences) Oct. 2007

文章编号：1007-1032(2007)05-0522-03

超级稻离体再生培养条件的优化

欧阳琳[a]，洪亚辉[a, b*]，王若仲[b]，周 涌[a]

(湖南农业大学 a.生命科学技术学院；b.湖南省植物激素与生长发育重点实验室，湖南 长沙 410128)

摘 要：以超级稻品种两优培九成熟胚为外植体，研究了外源激素和化学试剂对超级稻离体再生培养的影响. 结果表明，成熟胚在MS+2, 4-D 2 mg/L+KT 1 mg/L培养基上，愈伤组织诱导率达94%；愈伤组织在MS+6-BA 2 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基上，分化率为76.66%；当分化培养基中添加5 mmol/L $CuSO_4$，愈伤组织生长旺盛，分化率提高，可达86.66%.

关 键 词：超级稻；组织培养；愈伤组织

中图分类号：S511.035.3 **文献标识码**：A

Optimization of super rice in vitro cultivation conditions

OUYANG Lin[a], HONG Ya-hui[a, b*], WANG Ruo-zhong[b], ZHOU Yong[a]

(a.College of Biological Science and Biotechnology; b.Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: Using mature embryos of super rice variety, Liangyoupei 9, as explants, the effects of exogenous hommones and chemic reagent on the cellar culture of the super rice in vitro were investigated. The results showed that the induction frequency of mature embryos callus on MS+2, 4-D 2 mg/L + KT 1mg/L medium was 94%; the differentiation frequency of buds on MS+6-BA 2 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L medium, used as differentiation medium, was 76.66%; When 5 mmol/L $CuSO_4$ was added to the differentiational medium, it reached as high as 86.66% and the callus grew well.

Key words: super rice; tissue culture; callus

自从1996年中国启动了超级稻育种计划，超级稻研究始终居于世界领先水平[1]. 为了创造新的种质资源，组织培养及基因工程技术被广泛用于水稻研究，并取得了显著成果[2-4]. 在现代生物技术育种过程中，愈伤组织经常作为外源基因的受体，因此愈伤组织的质量及其分化植株的能力是影响水稻基因工程和水稻育种的重要因素，在改善愈伤组织质量和提高植株再生能力方面，科学工作者进行了大量研究，并取得了一定的成果[5-7].

笔者以超级稻两优培九成熟胚为试验材料，对水稻愈伤组织的诱导、分化进行了研究，以期通过在培养基中添加外源激素和特殊化学试剂[5, 8]，提高愈伤组织的质量和再生植株的频率.

收稿日期：2007-05-16

基金项目：国家自然科学基金项目(30600049)

作者简介：欧阳琳(1980-)，男，湖南邵阳人，硕士研究生. *通讯作者：yahuihong@vip.sina.com.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试水稻品种

超级稻两优培九，购自湖南省杂交水稻研究中心.

1.1.2 培养基

基本培养基采用MS，诱导培养基激素配比设7个组合，Ⅰ：MS；Ⅱ：MS+2, 4-D 1 mg/L；Ⅲ：MS+2, 4-D 2 mg/L；Ⅳ：MS+2, 4-D 5 mg/L；Ⅴ：MS+2, 4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L；Ⅵ：MS+2, 4-D 2 mg/L+KT 1 mg/L；Ⅶ：MS+2, 4-D 2 mg/L+ KT 2 mg/ L；都添加蔗糖30 g/L，琼脂7 g/L. 调pH到6.0.

分化培养基激素配比设计7个组合，Ⅰ：MS+6-BA 1 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L；Ⅱ：MS+6-BA 1 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 1 mg/L；Ⅲ：MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 2 mg/L；Ⅳ：MS+6-BA 2 mg/L+KT 2 mg/L+NAA 1 mg/L；Ⅴ：MS+

维普资讯 http://www.cqvip.com

6-BA 2 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L；Ⅵ：MS+6-BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 2 mg/L.

调 pH 到 6.0.

1.2 方　法

1.2.1 外植体处理

成熟胚：选取成熟饱满的水稻种子，剥去颖壳，淘汰致病发黑断裂的米粒. 在超净工作台内，先用70%乙醇浸泡 3～5 min，用无菌水冲洗种子 4～5次，再用0.1%升汞浸泡 8～12 min，用无菌水冲洗种子 4～5 次，每瓶 8 粒接种于 7 种浓度梯度诱导培养基中，置于培养箱中 26～28 ℃黑暗培养.

1.2.2 继代和分化培养

成熟胚盾片愈伤组织诱导培养 7 d 后，将黄色盾片愈伤从萌发的种胚剥离，转到新鲜诱导培养基上，做好标记(诱导Ⅰ～Ⅶ)，继代培养 7 d，统计愈伤组织出愈率.

选取自然分散的质地致密、淡黄色颗粒状的胚性愈伤组织，接种于分化培养基上，做好标记(分化Ⅰ～Ⅵ)先将材料暗培养 3 d 后转置光照条件下培养，用日光灯 1 000～1 200 lx 照明(16 h/d) 温度控制在 26～28 ℃. 培养 30 d 后统计分化率.

1.2.3 铜元素的添加对植株再生能力的影响

挑选自然分散的质地致密，呈淡黄色颗粒状的胚性愈伤组织，接种于含铜元素 5 mmoL/L 最佳分化培养基上，先将材料暗培养 3 d 后转置光照条件下培养，用日光灯 1 000～1 200 lx 照明(16 h/d) 温度控制在 26～28 ℃，隔 3～5 d 观察愈伤组织生长情况，培养 30 d 后统计分化率.

1.2.4 统计方法

种胚接种后每隔 3～5 d 观察 1 次，7 d 后进行第 1 次继代，14 d 后第 2 次继代并统计出愈率，分化培养 30 d 统计绿苗分化率.

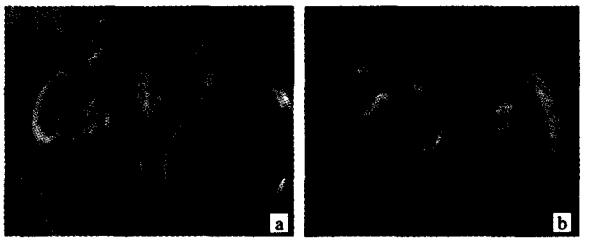
出愈率=(产生愈伤组织的种胚数/接种的种胚数)×100%.

绿苗分化率=(分化绿苗的愈伤组织块数/转移的愈伤组织块数)×100%.

2 结果与分析

2.1 超级稻成熟胚诱导愈伤组织

将成熟胚接种到诱导培养基上培养，7 d 后可观察到由盾片处长出直径 2～3 mm 的初始愈伤组织，呈淡黄色、瘤状、质地坚硬、紧凑(图 1-a). 继代培养 2 次后，愈伤组织体积变大，直径为 1.5～2.0 cm(图 1-b). 从愈伤诱导率上看，2,4-D 2.0 mg/L 愈伤诱导率最高，为 95%；当 2,4-D 5.0 mg/L 时愈伤诱导率最低，几乎不产生愈伤组织(表 1). 在相同浓度 2,4-D 的诱导培养基上，添加不同浓度的 KT，诱导率相差不大，分别为 89%，94%，90%，其中以 1 mg/L 为最高，诱导率达 94%，与单独添加 2,4-D 效果相近. 因此，可以认为，使用 2,4-D 2 mg/L 或 2,4-D 2 mg/L + KT 1 mg/L 诱导效果最佳.



a　7 d 后的初始愈伤组织；b　继代培养 2 次后的愈伤组织

图 1　成熟胚诱导的愈伤组织

Fig.1　Callus inducted by mature emtryos

2.2 同一诱导培养基所产生愈伤组织的分化

将从诱导培养基上继代后的愈伤组织转移到分化培养基后，愈伤状态比较好的第 8 天就开始出现绿点(图2-a)，15～20 d 后愈伤组织体积明显变大，直径为 1.5～3.0 cm，有的愈伤组织已分化成绿色小苗(图 2-b). 选取其中长势最好，来源于同一诱导培养基配方的愈伤组织产生的绿苗进行分析，统计分化率(表 2). 从表 2 可知，尽管诱导培养基相同，但由于分化培养基不同，分化率相差很大，其中以Ⅴ号分化培养基绿苗分化率最高，达 76.66%. 可以认为，6-BA 2 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 最有利于愈伤组织分化出芽，是最佳分化培养基. 同时，通过对比分析，发现高浓度 6-BA 和低浓度 NAA 有利于长芽，6-BA 和 KT 具有类似的功效.

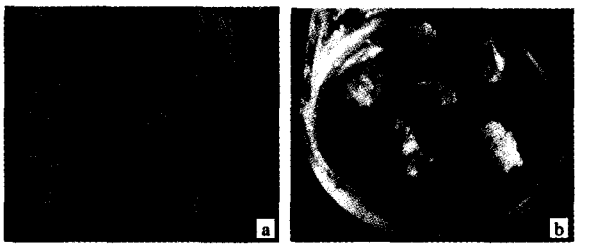


图 2　培养 8，20 d 后的愈伤组织

Fig.2　The callus by 8 days and 20 days

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同激素组合的愈伤组织出愈率

Table 1 The inducement rate of different incretion consistence on callus

处理	成熟胚数/个	形成的愈伤数/块	愈伤诱导率/%
Ⅰ	100	0	0
Ⅱ	100	44	44
Ⅲ	100	95	95
Ⅳ	100	8	8
Ⅴ	100	88	88
Ⅵ	100	94	94
Ⅶ	100	82	82

表 2 不同激素组合对愈伤组织分化的影响

Table 2 The infection of different incretion consistence to the differentiation of callus

处理	转移的愈伤数/块	分化绿苗的愈伤数/块	绿苗的分化率/%
Ⅰ	30	21	70.00
Ⅱ	30	16	53.33
Ⅲ	30	13	43.33
Ⅳ	30	20	66.66
Ⅴ	30	23	76.66
Ⅵ	30	17	56.66

2.3 不同诱导培养基所产生愈伤组织的分化

将来源于Ⅲ和Ⅴ号诱导培养基，在Ⅴ分化培养基产生的绿苗进行统计，结果列于表 3. 从表 3 可知，尽管分化培养基相同，但由于诱导培养基不同，绿苗分化率相差很大，添加 KT 对愈伤组织的诱导率的影响不显著，适当添加 KT 将明显改善愈伤组织的绿苗分化率. 同时，试验中还发现，添加了 1.0 mg/L KT 的继代培养基中生长的愈伤组织呈浅黄色，表面干爽，隐有颗粒，具有旺盛的分裂能力，经多次继代仍保持胚性状态. 相反，对于只添加 2,4-D 的继代培养基上生长的愈伤组织经多次继代后多呈粘液状，颜色灰暗、易褐化或变成松散易碎、失去胚性的细胞团.

表 3 不同诱导培养基产生的愈伤组织的分化率

Table 3 The differentiation rate of the callus from different inducement culture medium

分化培养基	诱导培养基	转移的愈伤数/块	愈伤数/块	绿苗分化率/%
Ⅴ	Ⅲ	50	33	66
Ⅴ	Ⅴ	50	38	76

2.4 添加铜元素对植株再生能力的影响

杨跃生等[8]认为，在分化培养基中添加合适浓度的 $CuSO_4$ 是提高水稻愈伤组织绿苗分化率的简单而有效的方法. 试验中发现，从Ⅴ号诱导培养基产生的愈伤组织转入含铜元素 5 mmoL/L 的Ⅴ号分化培养基上，进行芽分化试验，至第 5 天时，可见到一些愈伤组织表面出现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；培养基中不含 Cu^{2+}，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 8 ~ 10 d 时，才有绿点出现，20 d 时少数绿点区域开始形成幼芽. 20 d 后统计结果表明，尽管分化培养基一样，添加铜元素使得分化率明显提高，达到 86.66%，未添加的分化率仅为 75.83%.

3 小结与讨论

超级稻组织培养中，影响培养的因素有多方面，而植物激素是愈伤组织诱导和绿苗分化的关键性因素. 试验结果表明，2,4-D 是诱导愈伤组织主要的因素，低于 1 mg/L 高于 5 mg/L 2,4-D 都不适宜水稻成熟胚愈伤组织的诱导. 2,4-D 与 KT 配合使用更有利于愈伤组织胚性状态的保持和提高分化频率，因此在实际工作中，选择合适的培养基和适当的激素配比，是水稻基因工程育种过程中提高诱导率和分化率的重要前提.

水稻愈伤组织再生率提高与 POX 活性增强有关，铜处理激发了 POX 的活性，进而影响愈伤组织生长发育的进程，提高绿苗分化率.

参考文献：

[1] 徐庆国. 超级稻的研究现状与发展对策探讨[J]. 作物研究，2006(1)：13-16.

[2] Niizeki H，Oono K. Induction of haploid rice plant from anther culture[J]. Proc Jpn Acad Sci，1968，44：554-557.

[3] 颜昌敬. 水稻的组织培养——水稻译文集之四[M]. 上海：上海科学技术出版社，1981：1-3.

[4] 大野青春. 组织培养用于水稻改良[J]. 国外农学——水稻，1996(1)：7-10.

[5] 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[J]. 农业生物技术学报，1996，4(2)：124-127.

[6] 赵 燕，易自力，洪亚辉，等. 借助粒子轰击提高农杆菌转化水稻的频率[J]. 湖南农业大学学报：自然科学版，2001，27(3)：182-184.

[7] 刘清波，刘选明，周朴华. 水稻胚性愈伤组织继代培养中的生理生化特性[J]. 湖南农业大学学报：自然科学版，1998，24(3)：180-183.

[8] 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[J]. 中国水稻科学，1999，13(2)：95-98.

责任编辑：苏爱华
英文编辑：罗文翠