

# 反向核不育水稻 FHS 组织培养高频率植株再生

王松丽, 黄群策\*, 秦广雍

(郑州大学 离子束生物工程省重点实验室, 河南 郑州 450052)

**摘要:** 以反向核不育水稻品系 FHS 为研究材料, 对其成熟胚愈伤组织的诱导及其再生条件进行了研究。研究表明, 通过选择合适的培养基和调节 2,4-D 的浓度, 胚性愈伤组织的诱导率可以达到 92.5%。通过调节 MS 培养基中 KT 和 NAA 的浓度, 并加入适量的  $\text{CuSO}_4$ , 植株再生频率高达 81.3%。由此可见, 合适的激素浓度的高低与 FHS 植株再生频率的高低呈现出一定的相关性。

**关键词:** 反向核不育水稻; 组织培养; 愈伤组织; 诱导; 植株再

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)03-0278-04

## High frequency of plantlet regeneration from revers genic sterile rice FHS tissue culture

WANG Song-li, HUANG Qun-ce\*, QIN Guang-yong

(Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** The culture condition of callus formation and plantlet regeneration of revers genic sterile rice variety FHS was studied. By selecting suitable medium and adjusting the concentration of 2,4-D, the induction frequency of calli reached 92.5%; After adjusting the concentration of KT and NAA, the rate of calli differentiation was 81.3%. The result showed that the suitable concentration of phytohormone could promote the efficiency of FHS plantlet regeneration.

**Key words:** revers genic sterile rice; tissue culture; callus; induction; plantlet regeneration

两系法杂交水稻能否在生产上持续地大面积推广应用, 关键是育种工作者能否在短期内从根本上消除核雄性不育系在杂交制种时发生育性波动的潜在风险。自二十世纪 90 年代中期以来, 水稻育种者一直在寻找具有反向核雄性不育特性的水稻材料, 试图从育性的稳定性表达方面确保两系法杂交水稻制种的安全性。在我们获得反向核不育水稻品系 FHS 之后, 其生长势弱和产量低的特点严重制约了它在生产上的应用。采用常规育种方法对其进行遗传性

改良, 不仅对其筛选的周期长, 而且改良的效果相当有限。近年来发展起来的生物技术, 特别是转基因技术, 为快速改良水稻性状, 满足人们需要提供

了方便(马炳田等, 2002)。在转基因技术的研究中, 人们发现水稻器官组织的离体培养和植株再生困难重重, 特别是占整个水稻品种 80% 以上的籼稻, 愈伤组织的诱导和植株再生都尤为困难(王慧中等, 2000), 植株再生频率几乎都低于 80%, 并且品种的特异性相当明显(张玲等, 2002)。因此, 建立籼稻组织培养体系具有实际意义, 以至于籼稻组织培养体系的优劣, 在很大程度上将成为能否高频率转化和高频率获得转基因植株的关键。本研究以反向核不育水稻品系 FHS 为研究材料, 对其成熟胚愈伤组织的诱导及其再生条件进行了研究, 初步建立了 FHS 组织培养的高频率植株再生体系, 这为水稻的遗传

收稿日期: 2005-06-13 修回日期: 2005-12-09

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)[Supported by the National“15”Technology Research and Development Program(2001BA302B)]

作者简介: 王松丽(1979-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事生殖发育生物学研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence)

改良奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

利用低能氮离子束对粳型水稻品系 99-02 进行诱变处理,在其后代中筛选到具有育性转换特点的反向核不育水稻品系 FHS,其育性表现比较特殊,即在长日照高温的夏季条件下其花粉粒表现为部分可育,可以自交结籽,而在低温短日照的秋季条件下其花粉粒表现为完全不育,可以杂交制种(黄群策等,2004)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及继代 挑选籽粒饱满的成熟种子,剥去颖壳,用 70%酒精消毒 1 min,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 15 min,无菌水冲洗 5 次,然后接种于诱导培养基表面,置于 25 °C 培养箱进行暗培养。15 d 后统计愈伤组织诱导率并观察愈伤组织质量状况。挑选颗粒状的干爽胚性愈伤组织转移至新鲜诱导培养基进行继代,25 °C 条件下继续暗培养,进行继代增殖(杨跃生等,1996)。

1.2.2 愈伤组织的分化 从继代 10 d 左右的愈伤组织中挑选出淡黄色、结构致密、颗粒状、表面光滑、生长旺盛的胚性愈伤组织接种于分化培养基,25 °C 光照培养,光照强度 2 000~2 400 lx,每天光照 12 h,进行分化。30 d 后统计愈伤组织的分化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基成分对 FHS 成熟胚愈伤组织诱导率及其质量的影响

将 N6、MS 和 NB(姚方印等,2000)设为基本培养基,分别附加蔗糖 40 g/L,琼脂 7 g/L 和不同浓度的 2,4-D 作为诱导培养基(表 1)。在 2,4-D 浓度为 2 mg/L 时愈伤组织的诱导率都较高,但是基本培养基为 N6 和 NB 时,愈伤组织的质量较差,容易褐化;而基本培养基为 MS 时,愈伤组织生长良好,呈淡黄色,而且增殖快(图 1)。

### 2.2 分化培养基中激素对比对 FHS 愈伤组织分化率的影响

在 MS 基本培养基中附加酸水解酪蛋白 1 g/L,山梨醇 10 g/L,蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L 和不同配比的激素(pH=5.8)作为 FHS 愈伤组织的分化

培养基。当培养基中加入 KT 2.5 mg/L,NAA 0.5 mg/L,即 KT/NAA=5 时,植株再生频率极低,仅为 2%,大部分愈伤组织褐化死亡(图 2);调节两者比例,KT 浓度不变,NAA 0.25 mg/L,即 KT/NAA=10 时,愈伤组织长出大量的绿色芽点且褐化程度明显减轻(图 3),植株再生频率有所提高,可以达到 18.5%。

表 1 FHS 成熟胚在不同培养基中的愈伤组织诱导率及其质量评价

Table 1 The rate of callus induction and evaluation of quality from FHS mature embryo in different mediums

基本培养基 Basic medium	2,4-D (mg/L)	愈伤组织诱导率 The rate of callus induction(%)	愈伤组织质量评价 Evaluation of callus quality
MS	1	45.3	C
	2	92.5	B
	3	78.0	A
N6	1	36.2	C
	2	78.6	C
	3	65.5	A
NB	1	41.5	C
	2	81.7	A
	3	68.0	A

A,胚性愈伤,苍白,继代变褐死亡;B,胚性愈伤,淡黄色,繁殖较快;C,胚性愈伤,苍白,繁殖较慢。

A,embryogenic calli,cadaverous,but dead quickly;B,embryogenic calli,canary,growing fast;C,embryogenic calli,cadaverous,growing slowly.

### 2.3 铜对 FHS 愈伤组织分化的影响

从 FHS 愈伤组织中选择颜色淡黄、鲜嫩、肥大且干爽的愈伤组织接种于分化培养基:MS+酸水解酪蛋白 1 g/L+山梨醇 10 g/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L+KT 2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+CuSO<sub>4</sub> 60 μmol/L(pH=5.8)。愈伤组织生长良好,没有明显的褐化现象,培养 30 d 后,植株再生频率高达 81.3%,并且每块愈伤组织获得的再生植株数增加(图 4)。

### 2.4 再生植株的生根及其壮苗培养

愈伤组织分化出的完整植株十分瘦弱,需经壮苗培养才能移栽成活。将弱小植株转接入 1/2MS+0.5 mg/L NAA 的培养基中,在 25 °C、光照强度为 2 000~2 400 lx、每天光照 12 h 的条件下培养 10 d 后,再练苗 2 d,可得到生长健壮、根须发达的水稻再生植株(图 5)。

## 3 讨论

通过对籼稻材料 FHS 成熟胚组织培养的研究,

愈伤组织的诱导率及愈伤组织的质量取决于诱导培养基、激素含量等因素的影响。选择适宜的培养基是提高愈伤组织诱导率,获得高质量愈伤组织的基础。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,两者的成分有显著差异,对愈伤组织诱导和植株再生的效应也明显不同(贺红等,2004)。MS培养基和N6培养基相比,除了含有较高浓度的B,Mn,Zn之外,还含有Mo,Cu和Co。实验表明,只有铜元素具有明显促进水稻愈伤组织植株再生的作用(杨跃生等,1999a)。虽然MS培养

基中含有 $0.1 \mu\text{mol/L}$  Cu,对于部分双子叶植物组织和细胞培养可能合适,但对水稻愈伤组织生长是不够的(袁玲,2003)。在预分化培养基中添加 $6 \sim 60 \mu\text{mol/L}$ 的Cu,对愈伤组织的增殖有明显的促进作用;当浓度提高到 $180 \sim 240 \mu\text{mol/L}$ 时,则有明显的抑制作用;当浓度为 $120 \mu\text{mol/L}$ 时促进作用和抑制作用几乎相当,愈伤组织的增殖率没有明显的变化。在此基础上将愈伤组织转接于分化培养基,植株再生频率显著提高(杨跃生等,1999b)。

在植物组织培养中2,4-D被认为是诱导大多数

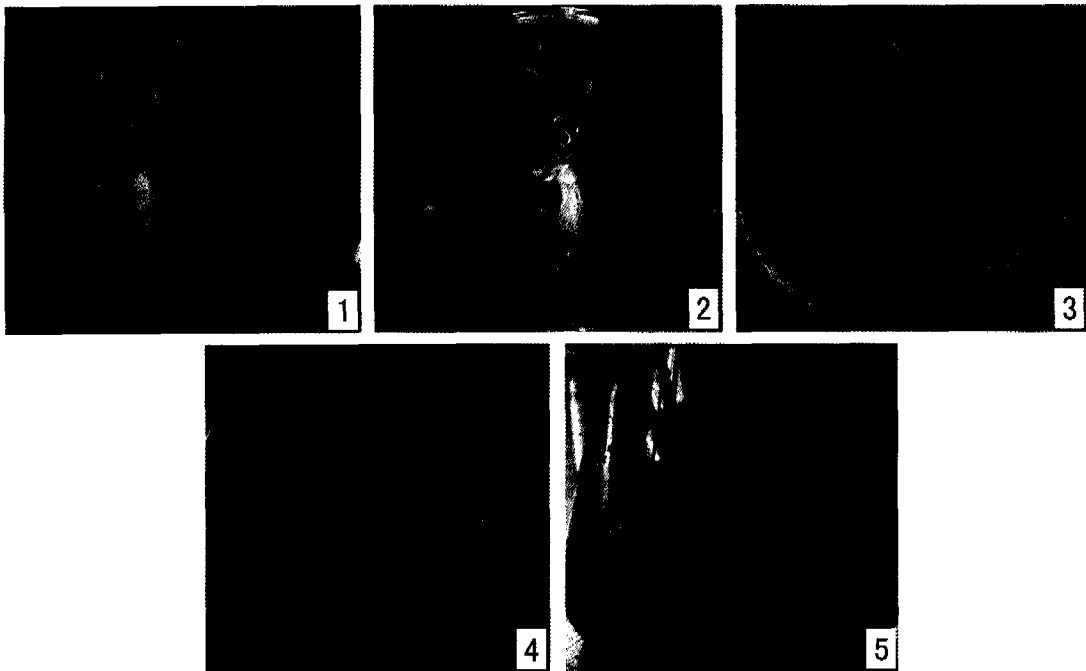


图 1-5 1. 淡黄色愈伤组织; 2. 分化培养基(KT/NAA=5); 3. 分化培养基(KT/NAA=10); 4. 分化培养基(加入 $60 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ ); 5. 健壮的再生植株。

Figs. 1-5 1. Canary callus; 2. Differentiation medium(KT/NAA=5); 3. Differentiation medium(KT/NAA=10); 4. Differentiation medium(add in  $60 \mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$ ); 5. Robust regeneration plantlet.

植物产生愈伤组织最有效的物质(张智奇,1991),但较高浓度的2,4-D对种胚具有一定的毒害作用,最终导致愈伤组织诱导率及愈伤组织质量呈现显著的差异。酸水解酪蛋白是多种氨基酸的混合物,对愈伤组织的生长和分化有促进作用。山梨醇在愈伤组织的分化中也有着重要的意义,它作为碳源能有效维持离体培养细胞的生存与分化,尤其是有蔗糖存在的情况下,细胞能够吸取足够的能量分裂生长(黄慧君等,1999)。

在分化培养基中激素的比例和微量元素Cu的含量起着至关重要的作用。因为激动素/生长素比值低时,诱导根的分化;两者比值处于中间时,愈伤组织

只生长而不分化;两者比值较高时,则诱导芽的形成,在芽的分化中,激动素起着重要作用(潘瑞炽,2001)。

在以往的研究报道中一般认为,铜(Cu)抑制植物的生长发育和器官分化。然而近年来的研究报告以及我们的试验结果表明,Cu作为植物生长发育所必需的微量矿质元素之一,在浓度较高时对植物产生明显毒害作用,但如能在其剂量和作用时间上加以控制,在适量和适时的情况下,Cu对植物不但没有毒害,反而有利于根、芽(枝)、花等器官的分化(祝沛平等,1999)。如Purnhauser(1991)、Purnhauser等(1993)报道Cu促进小麦、小黑麦愈伤组织形成枝和根。Cu在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时促进作用还大于 $0.5 \sim$

4 mg/L KT 或 6-BA 的作用。10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  下小麦再生率为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  下的 8 倍。然而,对于铜的作用机理研究报道较少,铜之所以能够促进水稻愈伤组织植株再生,我们认为,铜离子是许多酶的辅基,在培养基中添加铜离子,会使无活性或活性很低的酶与铜离子螯合,提高酶的活性,改变愈伤组织的代谢,从而促进细胞的分化和器官的形成(贺红等,2004)。要有效地利用 Cu 来调控植物的生长发育,必须探讨 Cu 在植物生长发育中的作用规律,进一步加深认识 Cu 在植物生理生化反应中的作用。

FHS 成熟胚愈伤组织高频率植株再生体系建立之后,在此基础上可以利用转基因方法克服物种间远缘杂交的障碍获得水稻新种质。二十世纪 80 年代兴起的离子束生物技术,它是低能重离子生物学的一个重要组成部分,是利用离子的极化和离子群的团化产生生物学效应的高新技术(黄群策等,2002)。离子束生物技术在水稻遗传改良中的应用主要是诱变作用和介导作用,其中离子束的介导作用打破了传统转基因法的操纵繁琐,转化率低,重复性差和基因型依赖性强的限制,是一种较简单易行的转基因方法(王松丽等,2004)。建立一个完善的组织培养体系可以使离子束生物技术具有更为广阔的应用前景。将离子束生物技术与组织培养技术完美结合可以创造出更多、更优的水稻种质资源,快速促进 FHS 在生产上的应用,使两系法杂交水稻应用范围更广、制种更安全。

#### 参考文献:

- 贺红,刘元凤,石岩,等. 2004. 籼稻粤香占和木棉占再生体系建立的探讨[J]. 广东农业科学, (1): 3-5.
- 潘瑞焱. 2001. 植物生理学(第四版)[M]. 北京: 高等教育出版社: 186-187.
- Huang QC(黄群策), Dai XM(代西梅). 2004. Biological effects of the rices with different ploidy after ion beam implantation of low energy  $\text{N}^+$  (低能氮离子束对不同倍性水稻的诱变效应)[J]. *Hybrid Rice*(杂交水稻), 19(3): 57-61.
- Huang HJ(黄慧君), Huang DQ(黄道强). 1999. Special functions of sorbitol on rice somatic cell culture(山梨醇对水稻体细胞培养的特殊作用)[J]. *Chin J Rice Sci*(中国水稻科学), 13(4): 248-250.
- Huang QC(黄群策), Li YF(李玉峰). 2002. Prospect of ion beam bio-technology in rice breeding(离子束生物技术在水稻育种中的应用前景)[J]. *Hybrid Rice*(杂交水稻), 17(5): 5-8.
- Liu YF(刘元凤), Liu YZ(刘彦卓), He H(贺红), et al. 2004. Factors influencing of callus induction and plantlet regeneration from mature embryos in indica rice(几种影响籼稻成熟胚愈伤组织诱导及再生的因素)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 40(3): 319-322.
- Ma BT(马炳田), Li P(李平), Zhou KD(周开达), et al. 2002. Study on culture ability of calli of elite indica rice lines (杂交籼稻亲本愈伤组织培养力的研究)[J]. *J Sichuan Agri Univ*(四川农业大学学报), 20(3): 200-204.
- Purnhauser L. 1991. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat (*Triticum aestivum*) callus cultures by copper [J]. *Cereal Res Conuru*, 19: 419-423.
- Purnhauser L, Bynlai G. 1993. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue culture[J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 35(2): 131-139.
- Wang SL(王松丽), Wang HY(王红艳), Huang QC(黄群策). 2004. Application of ion beam bio-technology in rice genetic improvement(离子束生物技术在水稻遗传改良中的应用)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 20(1): 14-16.
- Wang HZ(王慧中), Zhao PJ(赵培洁), Yan MX(颜美仙), et al. 2000. High frequency of plant regeneration from indica rice immature embryo(籼稻组织培养高频率植株再生)[J]. *Ziran Zazhi*(自然杂志), 22(4): 246-247.
- Yuan L(袁玲). 2003. Role of copper or silver on redifferentiation frequency of rice callus (铜、银元素对水稻愈伤组织绿苗分化率的作用)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), (1): 17-19.
- Yang YS(杨跃生), Jian YY(简玉瑜). 1996. Factors influencing quantitatively and qualitatively the plant regeneration in rice callus cultures(影响水稻愈伤组织再生植株数量和质量的因素)[J]. *J Agric Biotech*(农业生物技术学报), 4(2): 124-128.
- Yang YS(杨跃生), Jian YY(简玉瑜), Zheng YD(郑迎冬). 1999. Copper enhances plant regeneration in callus culture of rice(铜在水稻愈伤组织培养再生植株中的促进作用)[J]. *Chin J Rice Sci*(中国水稻科学), 13(2): 95-98.
- Yang YS(杨跃生), Zheng GC(郑贵朝), Jian YY(简玉瑜). 1999. A further study on the effects of copper in rice callus culture(铜在水稻愈伤组织培养中的作用的进一步研究)[J]. *Chin J Rice Sci*(中国水稻科学), 13(4): 245-247.
- Yao FY(姚方印), Zhu CX(朱常香), Liu LM(刘理梅), et al. 2000. Study on improving embryogenic callus induction and plant regeneration rates from mature embryos in rice(提高水稻成熟种胚愈伤组织诱导率及再生率的研究)[J]. *Shandong Agric Sci*(山东农业科学), (4): 7-9.
- Zhang ZQ(张智奇). 1991. Effects of sucrose concentrations, phytohormones and medium types on induction of rice embryogenic callus(蔗糖浓度、激素配比及不同培养方式对水稻胚性愈伤组织的诱导效应)[J]. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), 7(3): 16-22.
- Zhu PI(祝沛平), Li FY(李凤玉), Liang HM(梁海曼). 1999. Effect of copper on organ differentiation in plant(铜对植物器官分化的影响)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 35(4): 332-336.
- Zhang L(张玲), Xie CH(谢崇华), Li WF(李卫锋). 2002. Studies on the tissue culture of mature embryo in rice(水稻成熟胚组织培养研究)[J]. *Hybrid Rice*(杂交水稻), 17(2): 44-46.